

Adriano Luís Roque

**MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA NO
MODELO MURINO DA SÍNDROME DE DOWN –
TS65DN**

São Paulo – SP

2019

Adriano Luís Roque

**MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA NO MODELO
MURINO DA SÍNDROME DE DOWN – TS65DN**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do título de doutor em
Ciências.**

Orientadora: Profa. Dra. Talita Dias da Silva.

São Paulo – SP

2019

ADRIANO LUÍS ROQUE

**MODULAÇÃO AUTÔNOMICA CARDÍACA NO MODELO MURINO DA SÍNDROME
DE DOWN – TS65DN**

Presidente da banca: Profa. Dra. Talita Dias da Silva

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Suely Steinschreiber Roizenblatt

Prof. Dr. Valdelias Xavier Pereira

Profa. Dra. Viviani Barnabé

Prof. Dr. Carlos Bandeira de Melo Monteiro

Aprovado em ____/____/____

“Chega um momento em sua vida, que você sabe:
Quem é imprescindível para você, quem nunca foi,
quem não é mais, quem será sempre!”.

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Donizete** e **Maria**, que incontáveis vezes fizeram o sacrifício de renunciaram aos próprios sonhos, para que nós, seus filhos, pudéssemos realizar os nossos. Aos ensinamentos que me deram durante minha vida: ter respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. Obrigado pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.

Aos meus irmãos: **André Roque**, **Amarilis Roque**, **Armoni Roque** e **Arnom Roque**, obrigado por sempre acreditarem em mim e por sempre me apoiarem e ajudarem em todos os momentos.

A minha amada esposa: **Sindy Magri Roque**, pelo companheirismo, por me ajudar em todos os momentos desde que nos conhecemos e por ser uma supermãe para a pessoazinha mais importante da minha vida.

Ao meu querido filho **Davi Magri Roque**: sei que ainda é muito pequeno para entender o quanto você é importante para mim, você sempre será a razão de tudo que faço nesta vida.

Aos meus sogros e cunhados: **Sincleris Magri** e **Débora Magri**, **Marisa Roque**, **Amanda Pimentel**, **Charles Meneghin**, **Ceuly Magri**, **Celisy Magri**, **Anderson Carneiro**, por todo apoio e ajuda necessários nesse processo. E é claro que não poderia me esquecer de vocês três, minhas queridas sobrinhas, **Julia Carneiro**, **Elisa Meneghin** e **Talita Roque**, vocês são demais, amo muito vocês.

À uma família em especial: **Luciano Mello**, **Cícera Mello**, **Mariana Mello** e **Ana Clara Mello**, obrigado por todo apoio durante esse processo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, fonte de toda a sabedoria, faltar-me-ia palavras para descrever Sua importância em todos os momentos da minha vida e em especial durante essa longa jornada. Devo-lhe graças pelo resto de minha vida por me conceder saúde e sabedoria para a realização de mais este sonho.

À minha amiga, orientadora e companheira de pesquisa, **Dra. Talita Dias da Silva**: obrigado por me ajudar desde o início da minha carreira de pesquisador, por me auxiliar em todos os processos de minha tese e por me acolher como orientadora no final dessa longa jornada.

Ao meu amigo, mentor e orientador, **Dr. Luiz Carlos de Abreu**: obrigado por acreditar em mim, por tornar possível tantos sonhos que hoje são realidade dentre eles: me tornar doutor em ciências, estudar em uma universidade de renome (UNIFESP) e fazer intercâmbio nos Estados Unidos em uma universidade de referência (Case Western Reserve University), e de quebra conhecer várias pessoas importantes durante essa aventura que foi meu processo de pós graduação.

Ao meu também amigo, mentor e orientador, **Dr. Alberto Costa**, por abrir as portas de seu laboratório nos Estados Unidos, por também abrir ainda mais as portas do conhecimento científico, e por me ajudar em todos os momentos que tive o privilégio de passar no seu departamento.

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP**, por ser minha segunda *Alma Mater*, a quem devo os agradecimentos pelo acolhimento, conhecimento e crescimento como pessoa e pesquisador.

Ao meu querido amigo e primeiro mentor, **Dr. Vitor Engrácia Valenti**: obrigado por me introduzir no caminho da pesquisa, pelos ensinamentos, orientações e parceria desde minha graduação.

Ao meu professor, orientador e amigo **Dr. Celso Ferreira**: agradeço primeiramente pelo privilégio de conhecê-lo e partilhar do seu vasto conhecimento, não só científico, mas também de vida, pelas orientações prestadas, pelo apoio de sempre em todos os momentos e circunstâncias.

To **Jonah Scott-Mckean** and **Melissa Stasko**: I have to thank you guys for everything you did for me, for all knowledge and friendship shared. I could not talk about Cleveland without mention you both.

To **Young Lee**: thank you for the privilege to meet you and your family. For all knowledge, friendship and partnership.

To **Mark Johnson**: for all help, knowledge, and hard work with all the mouse data.

Aos amigos que fiz nos Estados Unidos, **Bruna Zampieri**, **Daniella Victorino** e **Diego Lucena**, obrigado por me ajudarem a deixar Cleveland um pouco mais brasileira.

Aos meus caros amigos **Elias Xavier**, **Margarete Afonso** e **Fernando Rocha**: obrigado a todos pela ajuda e apoio em todo o processo.

A minha colega **Dra. Tatiana Dias de Carvalho**, por toda a ajuda prestada, pelo apoio moral e didático, por todo o conhecimento trocado durante esses anos.

A todos os meus amigos e companheiros da **Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina UNIFESP-EPM**, bem como da **Faculdade de Medicina do ABC – Laboratório de Delineamento de Pesquisa e Escrita Científica FMABC**, com quem tive a honra de trabalhar durante esses anos, pela amizade, companheirismo e troca de conhecimento.

Ao meu caro amigo e secretário do departamento de pós-graduação em medicina – Cardiologia, **Carlos Eduardo Braga (Kadu)**: por toda a paciência, ajuda e compreensão em todos os momentos desta jornada.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)**, por ser a agência provedora do fomento para esta pesquisa, tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos.

E finalmente: a todos que, de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARC	Centro de Recursos Animais (<i>Animal Resource Center</i>)
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência cardíaca
FFT	Transformada rápida de Fourier (<i>fast Fourier transform</i>)
HF	Alta frequência (<i>high frequency</i>)
HSA 21	Cromossomo 21 humano (<i>human chromosome 21</i>)
Hz	Hertz
LF	Baixa frequência (<i>low frequency</i>)
LF/HF	Razão entre baixa e alta frequência
LTD	Depressão de longa duração (<i>Long Term Depression</i>)
LTP	Potenciação de longa duração (<i>Long Term Potentiation</i>)
MMU 16	Cromossomo 16 em camundongos (<i>Mouse chromosome 16</i>)
ms ²	milissegundos ao quadrado
NMDA	N-metil D-Aspartato
NN50	Quantidade de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50ms
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
pNN50	Porcentagem dos intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50ms
QI	Quociente de Inteligência

RMSSD	Raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos RR normais sucessivos
RR	Intervalos RR
RRtri	Índice triangular
SD1	Desvio padrão da variabilidade instantânea batimento a batimento
SD1/SD2	Razão entre SD1 e SD2
SD2	Desvio padrão em longo prazo dos intervalos RR contínuos
SDANN	Desvio padrão das médias dos intervalos RR normais a cada 5 minutos, expressa em milissegundos
SDNN	Desvio padrão da média de todos os intervalos RR normais
SDNNi	Média dos desvios padrão dos intervalos RR normais a cada 5 minutos, expressa em milissegundos
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TINN	Interpolação triangular dos intervalos RR
TR	Translocação Robertsoniana
TS 16	
Ts65Dn	Camundongo Modelo da Síndrome de Down
UF	Ultra baixa frequência (<i>ultra low frequency</i>)
un	Unidades normalizadas
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VLF	Muito baixa frequência (<i>very low frequency</i>)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras:

Figura 1	Translocação Robertsoniana
Figura 2	Análise no domínio do tempo: Índices estatísticos
Figura 3	Análise no domínio do tempo: Índices geométricos
Figura 4	Cálculo dos índices SD1 e SD2 do gráfico de Poincaré
Figura 5	Esquematização do protocolo de coleta de dados
Figura 6	MouseRack
Figura 7	Configuração dos eletrodos do MouseRack
Figura 8	Gravação com o MouseRack
Figura 9	Cálculo do pNN50
Figura 19	Cálculo do SDNN
Figura 11	Cálculo do RRtri
Figura 12	Gráfico de Poincaré
Figura 13	Bandas de frequência da análise espectral

Tabelas:

Tabela 1	Média e desvio padrão dos índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de isoproterenol
Tabela 2	Média e desvio padrão dos índices geométricos de variabilidade da frequência cardíaca dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de isoproterenol
Tabela 3	Média e desvio padrão dos índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de carbacol
Tabela 4	Média e desvio padrão dos índices geométricos de variabilidade da frequência cardíaca dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de carbacol

RESUMO

Introdução: O camundongo Ts65Dn é o animal modelo da síndrome de Down mais utilizado em todo o mundo. Diferenças na modulação autonômica cardíaca em indivíduos com síndrome de Down já foram descritas. Estudos farmacológicos em modelos animais podem contribuir para o esclarecimento das controvérsias sobre a origem das alterações na variabilidade da frequência cardíaca apresentadas em pessoas com a síndrome de Down. **Objetivo:** Caracterizar a modulação autonômica cardíaca em camundongos Ts65Dn sob efeito de agonistas adrenérgicos e colinérgicos. **Método:** Foram considerados eletrocardiogramas gravados de 10 animais Ts65Dn e 10 controles. Para análise dos dados foram considerados 30 minutos de repouso seguido de 4 momentos distintos pós administração do fármaco (5, 10, 20 e 30 minutos). A análise da VFC foi realizada por meio de índices lineares no domínio do tempo. **Resultados e Discussão:** Outras hipóteses foram levantadas por meio dos resultados do nosso trabalho e, poderão ser avaliadas em estudos futuros, como a quantidade de enzimas degradadoras de fármacos, a sensibilidade dos animais com relação a esses agentes químicos, a quantidade de receptores adrenérgicos e colinérgicos desses animais. Foi possível constatar uma possível super expressão do gene *GIRK2* nos animais modelos com consequente aumento da resposta colinérgica, o que pode explicar a intensificação da variabilidade da frequência cardíaca nesses modelos da SD. **Conclusões:** Os camundongos Ts65Dn, apresentam déficit na modulação autonômica cardíaca quando comparados com o grupo controle, mostrados principalmente pela redução de índices relacionados a variabilidade global (SD2 e SDNN).

Palavras-chave: Frequência cardíaca; síndrome de Down; sistema nervoso autônomo, sistema cardiovascular, modelos animais, Ts65Dn.

ABSTRACT

Introduction: The Ts65Dn mouse is the most widely used animal model of Down syndrome (DS). Differences in autonomic regulation of heart rate variability (HRV) in individuals with DS have been hypothesized. Pharmacological studies in animal models may help us understand mechanisms underlying observed changes in HRV in people with DS. **Objective:** Characterize cardiac autonomic modulation in a mouse model of Down Syndrome. **Method:** We recorded electrocardiograms (ECGs) from 10 Ts65Dn and 10 euploid control mice. For analysis of the data, we considered 30 minutes of baseline, followed by injection of adrenergic (isoproterenol) or cholinergic (carbachol) agonists. HRV analysis was performed using linear indices in time domain. **Results and Discussion:** Our results allow us to raise other hypotheses that may be evaluated in future studies, the amount of drug-degrading enzymes present in these mice, the sensitivity of the animals to these chemicals, the amount of adrenergic and cholinergic receptors of the Ts65Dn mice. Ts65Dn mice showed a possible overexpression of the GIRK2 gene and it seems to have increased cholinergic response and, consequently explaining the increase in heart rate variability found in these mice models of DS. **Conclusion:** Ts65Dn mice presents deficits in cardiac autonomic modulation when compared with the euploid control group, mainly due to the reduction of indices related to global modulation (SD2 and SDNN)

Keywords: Heart rate; Down syndrome; autonomic nervous system, cardiovascular system, animal models, Ts65Dn.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Síndrome de Down.....	20
1.2 Modelos Animais	24
1.2.1 Características dos camundongos em geral	25
1.2.2 Modelos murinos da Síndrome de Down.....	26
1.2.3 Trissomia em camundongos	27
1.2.3.1 Ts65Dn.....	28
1.3 Fármacos com ação no sistema nervoso autônomo	31
1.3.1 Isoproterenol	31
1.3.2 Carbacol.....	31
1.4 Modulação Autonômica Cardíaca	32
2 Objetivos	38
3 Método	39
3.1 Desenho do Estudo.....	39
3.2 Aspectos Éticos.....	39
3.3 Animais.....	40
3.4. Protocolo de registro eletrofisiológico.....	41
3.5 Gravação dos dados cardiológicos por meio do MouseRack.....	43
3.6 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	45
3.6.1 Índices lineares	45

3.6.1.1 Índices estatísticos	45
3.6.1.2 Índices geométricos.....	46
3.7 Análise Estatística	48
4 Resultados	49
5 Discussão.....	62
6 Conclusões.....	70
7 Referências	71
8 ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos nas áreas da ciência e da medicina proporcionaram, dentre muitos outros benefícios, aumento significativo da expectativa e da qualidade de vida da população em geral, especialmente quando considerados indivíduos com alterações genéticas como a síndrome de Down (SD).

A SD é a causa mais comum de deficiência intelectual de etiologia genética, presente em aproximadamente 1 a cada 600 a 700 nascimentos. Os primeiros registros antropológicos acerca da SD foram encontrados na América do Sul, mais precisamente nas fronteiras entre Equador e Colômbia. Tais registros foram deixados por povos da cultura Tumaco-La Tolita em peças de cerâmica e remontam ao período compreendido entre 600 a 300 anos a.C.¹ Entretanto, as primeiras descrições fenotípicas relacionadas a SD datam do século XIX e, apesar de terem sido iniciadas pelos franceses Jean-Etienne-Dominique Esquirol (1838) e Edouard Seguin (1846), foi o médico inglês John Langdon Haydon Down, em 1866, quem forneceu a primeira descrição clínica consistente e detalhada sobre a síndrome^{2,3}. De etiologia desconhecida por quase cem anos, a causa da SD foi elucidada apenas em 1959 pelo pediatra e geneticista francês Jérôme Jean Louis Marie Lejeune. Em conjunto com seus colaboradores, Lejeune, ao avaliar o cariótipo de uma criança com a suposta síndrome, constatou que a mesma era causada pela presença de uma cópia extra do cromossomo 21⁴⁻⁸.

Além da forma livre, diferentes formas de trissomia do cromossomo 21 são conhecidas, como as translocações e o mosaicismo. As principais características clínicas decorrentes da expressão do cromossomo 21 extra envolvem fenótipos físicos e comportamentais, tais como déficit intelectual, hipotonia muscular,

frouxidão ligamentar, cardiopatias congênitas, baixa imunidade, distúrbios auditivos, visuais e gastrointestinais e alterações no desenvolvimento psicomotor^{6,9,10}.

Os modelos animais têm permitido aos cientistas avançar na compreensão dos aspectos genético-clínicos da SD, bem como no entendimento das bases celulares e moleculares da sua expressão fenotípica. Em 1975, a primeira linhagem de camundongos portadores de aneuploidias, o Ts16, foi criada para o estudo da síndrome¹¹. Entretanto, por conter uma trissomia completa do cromossomo 16, este animal não sobrevive ao nascimento, o que o torna útil apenas para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento embrionário/fetal¹². Posteriormente, na década de 90, um novo modelo murino para o estudo da trissomia do cromossomo 21 foi criado: o Ts65Dn¹². Com o avanço da engenharia genética vários outros modelos murinos foram descritos para estudos da SD^{13,14}, porém o Ts65Dn é o único com uma trissomia livre.

Dos anos 90 até os dias atuais, o camundongo Ts65Dn foi extensivamente estudado¹⁵⁻²³. Este animal carrega uma cópia extra de um segmento do cromossomo 16, em que parte dos genes são homólogos aos do cromossomo 21 da espécie humana. Tais animais exibem muitas características fenotípicas comumente observadas na SD, como déficits de aprendizado e memória, atraso no desenvolvimento, cardiopatia congênita, dentre outras¹².

Apesar da maioria dos estudos envolvendo o Ts65Dn terem sido desenvolvidos na área da neurociência, pode-se citar alguns estudos que foram conduzidos com o objetivo de caracterizar aspectos fenotípicos do sistema cardiovascular de tais animais²⁴⁻²⁶. Dentre os fenótipos descritos estão: arco aórtico

direito com divertículo de Kommerell, tronco arterioso persistente, arco aórtico direito com canal arterial e artéria subclávia direita aberrante²⁵.

O estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) tem emergido como um método não invasivo pelo qual diferentes parâmetros baseados na variação dos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos são analisados. Tal técnica pode ser utilizada para o estudo dos mecanismos relacionados a modulação autonômica cardíaca tanto em processos fisiológicos quanto em condições patológicas, sendo comumente quantificada por métodos lineares, nos domínios do tempo e da frequência, e não lineares, baseados no domínio do caos ²⁷⁻²⁹.

Os modelos animais representam uma importante ferramenta disponível para a análise da modulação autonômica cardíaca in vivo nos processos fisiológicos ou patológicos. Vários estudos em camundongos têm utilizado a metodologia de VFC para avaliar a modulação de respostas cardiovasculares em situações de hipóxia, hipercapnia e medo, por exemplo. Tal técnica também foi utilizada para o estudo dos mecanismos envolvidos na regulação da insulina pela resposta parassimpática cardíaca em um modelo de camundongo para a diabetes tipo 1. Contudo, não existem relatos na literatura sobre o estudo da VFC em camundongos Ts65Dn²⁸⁻³¹.

Estudos demonstraram que indivíduos com a SD apresentam baixa capacidade de esforço físico, incompetência cronotrópica e redução significativa das respostas de frequência cardíaca e pressão arterial ao exercício físico ³²⁻³⁷, o que sugere uma disfunção na modulação autonômica cardíaca destes indivíduos³⁸. Iellamo e colaboradores (2005) sugeriram que tal disfunção decorre de uma diminuição tanto na ativação da atividade simpática quanto na vagal³⁹. Em

contrapartida, o estudo de Carvalho e colaboradores³⁹ demonstrou, por meio da análise da VFC em indivíduos com a SD, um aumento nos índices que representam a atividade simpática, bem como nos índices que mostram a modulação global³⁹.

Mesmo com uma quantidade considerável de artigos relacionando pacientes com a SD e os índices da VFC, as conclusões apresentadas pelos pesquisadores parecem estar longe de um consenso. Carvalho e colaboradores⁴⁰, apresentaram recentemente uma meta-análise e uma revisão sistemática sobre a variabilidade da frequência cardíaca em indivíduos com a síndrome de Down. Os 13 artigos utilizados no trabalho, mostraram disfunção autonômica nas pessoas com a SD, contudo os mecanismos fisiológicos responsáveis por essas alterações ainda não estão consolidados na literatura⁴⁰. Estudos experimentais de estimulação farmacológica dos sistemas nervosos simpático e parassimpático, podem contribuir para o esclarecimento das controvérsias sobre a origem das alterações na variabilidade da frequência cardíaca apresentadas em pessoas com a síndrome de Down.

1.1 Síndrome de Down

Em aproximadamente 95% dos casos a doença é originada por trissomia simples, que é caracterizada por não disjunção durante a meiose na gametogênese, resultando em uma inteira cópia extra do cromossomo 21. Em outros 3% a 4%, trata-se de uma translocação desequilibrada entre o cromossomo 21 e outro acrocêntrico, geralmente o 14. Os remanescentes, por volta de 2%, são casos de mosaïcismo, nos quais estes indivíduos apresentam duas linhagens de células, uma normal e outra trissômica^{6,41}.

A prevalência da SD é de 14 a cada 10.000 nascidos vivos nos Estados Unidos⁴², 11,2 a cada 10.000 nascidos vivos na Europa⁴³ e de um a cada 700 nascidos vivos no Brasil^{6,44}.

Trata-se da principal causa genética que determina o comprometimento intelectual^{9,43}, apresentando manifestações físicas e sistêmicas bem definidas que possibilitam o diagnóstico precoce^{6,10,41} e está presente em todos os grupos étnicos⁴⁵.

O fenótipo no período neonatal encontra-se caracterizado, em aproximadamente 40% dos casos apresentando hiporreflexia de Moro, hiperflexibilidade articular, hipotonia, face achatada, prega cutânea em região cervical posterior, fenda palpebral oblíqua, displasia da pelve, malformação do pavilhão auricular, displasia da falange média do quinto dedo, prega única palmar transversa. Já nas faixas etárias que se seguem, são frequentes a hipotonia muscular, língua protrusa e/ou fissurada, braquidactilia mais evidente, e pés pequenos. A pele abundante no pescoço e a diástase dos músculos retos abdominais tendem a desaparecer nessa época^{6,10,41}. Há também outras

manifestações bastante comuns, a saber: anomalias cardíacas em 40 a 50% dos casos^{35,36,38,46}, disfunções motoras (100%), problemas auditivos (50 a 70%), visuais (15 a 50%)^{6,10}, acometimento neurológico (5 a 10%)^{9,43}, apneia obstrutiva do sono (50% a 79%)^{47,48} e obesidade^{38,41,49}.

O crescimento de crianças com SD difere das demais^{41,49}, pois se caracteriza por precocidade no início do estirão de crescimento e velocidade reduzida de crescimento linear, o que resulta em indivíduos de estatura mais baixa em relação à população em geral⁶. Pontualmente, há três períodos de faixa etária em que as diferenças de altura entre crianças com e sem SD aumentam: durante a gravidez, durante os três primeiros anos de vida e durante a puberdade⁴³. Adicionalmente, essas crianças apresentam alto risco de muitas doenças que influenciam o crescimento⁴³ e a partir de características peculiares presentes em lactentes e crianças pode ocorrer a potencialização do atraso, referente ao desenvolvimento global.

A alteração do tônus muscular pode tornar mais difícil a movimentação e sua precisão pelo acometimento de músculos e ligamentos articulares, gerando uma diminuição da estabilidade e consequente atraso nas trocas posturais, manutenção de posturas e aquisições motoras como: segurar a cabeça, sentar, engatinhar, andar etc.^{6,50}. Já na musculatura lisa, causa diminuição de batimentos ciliares do trato respiratório, levando ao acúmulo de secreção e possível quadro de infecções e hospitalizações. A permanência no hospital pode interferir inclusive no desenvolvimento neuropsicomotor, pois priva lactentes e crianças do convívio social e da estimulação espontânea do desenvolvimento^{6,41}. Ainda em relação ao trato respiratório, há casos de obstrução das vias aéreas superiores associados à pseudo-macroglossia e obstrução laringotraqueal. Muitos desses casos são

acompanhados de hipóxia, gerando desconforto e incoordenação dos músculos respiratórios^{6,41}. O risco para o desenvolvimento de doença vascular pulmonar é elevado e pode ocorrer mesmo na ausência de doença cardíaca estrutural. Além disso, há comprometimentos imunitários que aumentam a vulnerabilidade a infecções^{6,10}.

Em mais de 50% dos casos de SD há comprometimentos endócrino-metabólicos, como: alterações tireoidianas, distúrbios na secreção do hormônio de crescimento e deficiência adrenal^{3,6}. O hipotireoidismo está presente em mais de 60% dos casos e alterações vinculadas aos hormônios gonadais em 27%. As mulheres apresentam ciclo menstrual normal e os homens podem ter hipomotilidade dos espermatozóides, porém pacientes de ambos os sexos são férteis⁶.

Pessoas com SD também apresentam anomalias funcionais e estruturais do trato digestório. São comuns casos de atresia do duodeno, muitas vezes associada à obstrução de jejuno e íleo; ânus imperfurado, pâncreas anular, estenose do piloro, entre outras. Doenças relacionadas à má absorção dos alimentos podem aparecer, como doença celíaca e megacólon^{6,41}.

Com relação às alterações cerebrais da síndrome^{9,50,51}, o peso da massa encefálica de um recém-nascido com SD é o mesmo que o de um sem a anomalia, porém durante a infância, atinge apenas 75% do crescimento esperado, levando a possíveis comprometimentos de plasticidade e velocidade de maturidade neuronal⁶.

São também observadas anormalidades em várias regiões do cérebro, como: lobos frontais pequenos, lobos occipitais encurtados, hipocampo e cerebelo pequenos; juntamente com patologia cérebro-cortical difusa, que inclui distúrbios na

densidade neuronal, desenvolvimento de espinhas dendríticas e do funcionamento sináptico⁵⁰. Aparentemente, algumas dessas alterações são relevantes para a deficiência intelectual⁵¹, porém não por redução na quantidade de neurônios, e sim por diminuição das redes sinápticas⁶. O grau de comprometimento cognitivo é variável e pode ser leve (QI de 50-70), moderado (QI de 35-50), ou ocasionalmente severo (QI de 20-35)⁴¹.

No tocante ao sistema cardiovascular, aproximadamente 40% das crianças com síndrome de Down têm cardiopatia^{35,36,38,46}, sendo que os defeitos dos septos atrial e ventricular são os mais comuns. Desta forma, podem ser citadas: comunicação interventricular (32%), comunicação interatrial (10%) (dos tipos fossa oval, *ostium primum* e *ostium secundum*), persistência⁵⁰ do canal arterial (25%), tetralogia de Fallot (6%), entre outras malformações^{6,41,52}.

Independentemente da presença de cardiopatias, a disfunção autonômica tem sido mencionada, sobretudo em resposta a tarefas excitatórias, como testes autonômicos^{36,46} e exercício físico^{35,38}.

Embora ainda seja inferior à da população controle, recentemente, houve um aumento substancial na expectativa de vida das pessoas com SD. Passando de nove anos, em 1900, 30 anos em 1960 para mais de 50 anos nos dias de hoje³, com um relato na literatura de uma pessoa que viveu até a idade de 83 anos^{53,54,55}. Esse ganho ocorre em razão de cirurgias bem sucedidas de cardiopatia congênita, evoluções no tratamento de anomalias do trato gastrointestinal e dos cuidados preventivos de saúde³. Além disso, serviços de educação melhorados, disponibilidade de mais informações e, conseqüentemente, maior aceitação social das pessoas com deficiência na comunidade levaram a desinstitucionalização das

peessoas com SD⁵⁵. Isso vem ratificar a importância de recursos clínicos e sociais que contribuam para melhoria do resultado geral e da qualidade de vida das pessoas com SD.

1.2 Modelos Animais

É impossível negar a importância da experimentação animal na biologia e muito do que se sabe hoje no campo das ciências em humanos deve ser atribuído ao estudo comparativo realizado em outros seres vivos. Esse assunto remonta 2500 anos atrás e até os dias atuais é o epicentro de uma discussão secular a respeito da ética de experimentos em animais⁵⁶.

Modelos animais têm sido utilizados na pesquisa desde o século cinco antes da era cristã, quando Alcmeão de Crotona, baseado em estudos feitos em animais, evidenciou o cérebro como o centro da inteligência e da integração sensorial⁵⁷. Depois dele vários outros filósofos e médicos, como Aristóteles, Erasístrato, Galeno e Avenzoar se aventuraram na pesquisa em outros seres vivos. Este último, um médico muçulmano, praticava técnicas cirúrgicas em animais antes de testá-las em seres humanos, como por exemplo a traqueostomia⁵⁸.

No ano de 1628, um médico inglês, William Harvey, publicaria seus trabalhos que viriam a mudar drasticamente o conhecimento sobre o sistema circulatório: Enquanto a maioria dos pesquisadores de sua época acreditava que os pulmões eram os responsáveis pela movimentação do sangue pelo corpo, esse pesquisador provou, pelos seus estudos, que era a contração cardíaca que permitia o fluxo sanguíneo pelos pulmões, coração e por todo o corpo. Seus estudos foram

baseados em anatomia comparada de vários animais, peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos, além de várias outras espécies onde não só comparava mas manipulava esses animais *in vivo* e *postmortem*, dissecando e isolando partes do coração, ligando e desligando artérias, entre outras técnicas que possibilitaram descrever detalhadamente o sistema circulatório humano baseado em estudos de modelos animais⁵⁹.

Sabe-se nos dias atuais que estes pequenos animais compartilham aproximadamente 99% dos nossos genes⁶⁰. Além de descreverem várias doenças, como o diabetes, aterosclerose, doenças cardiovasculares, tumores, glaucoma, anemia, obesidade, osteoporose, asma, além de doenças neurológicas.

1.2.1 Características dos camundongos em geral

A utilização de experimentos em laboratório com camundongos tornou-se comum somente no século XIX. Suas características, como por exemplo, pequeno porte, prolíferos, período de gestação e ciclo de vida curtos, serem de fácil acesso para a administração de fármacos (vias intraperitoneal, oral, muscular, venosa e até intracerebral), apresentarem condições simples de domesticação (se acomodam em locais de tamanho pequeno e essencial às suas necessidades) e manutenção, os tornaram, a partir de 1900, num importante modelo experimental para estudos na área de genética⁶¹. Leon⁶² acrescenta que camundongos são considerados um excelente modelo para estudos genéticos, devido haver uma grande similaridade genética a seres humanos e da maneira relativamente simples com que seu genoma pode ser manipulado⁶².

Com relação às características cardiovasculares desses animais, algumas variáveis devem ser ressaltadas, como é o caso da frequência cardíaca e

da pressão arterial, em que estudos demonstram que a primeira, na média, pode alcançar cerca de 630 batimentos por minuto em repouso, ou seja, superior a seis vezes o encontrado seres humanos⁶³, já a pressão arterial fica em torno de 147×106 ⁶⁴, esses pormenores precisam ser criteriosamente considerados quando se avalia a função cardíaca dos camundongos para evitar a identificação de falsas alterações.

1.2.2 Modelos murinos da Síndrome de Down

Pesquisas em modelos murinos de várias doenças tem se tornado essenciais para o entendimento de moléstias humanas. Algumas das suas características especiais incluem a facilidade de criação e manutenção desses animais, o ciclo de vida acelerado, a extensa gama de possibilidades de experimentação (muitas delas que seriam técnica e eticamente impossíveis em seres humanos), além do vasto conhecimento sobre a genética desses camundongos o que possibilita a criação de animais transgênicos com características muito parecidas com as encontradas nos humanos. Como qualquer outro modelo animal, se forem levadas em conta as limitações e guardadas as devidas proporções que esses animais merecem, estes podem ser considerados grandes parceiros para o entendimento da fisiologia da síndrome de Down⁶⁵.

Foi o professor e médico alemão Alfred Gropp o pioneiro, na década de 70, a observar múltiplas translocações robertsonianas (**Figura 1**) homozigóticas em camundongos do gênero *Mus poschiavinus*. Uma de suas maiores realizações como cientista foi o desenvolvimento e aproveitamento de linhagens de camundongos contendo translocações robertsonianas específicas derivados do *Mus poschiavinus* e

de vários outros camundongos selvagens, Groop disponibilizava esses animais de maneira gratuita para pesquisadores mundo afora¹¹.

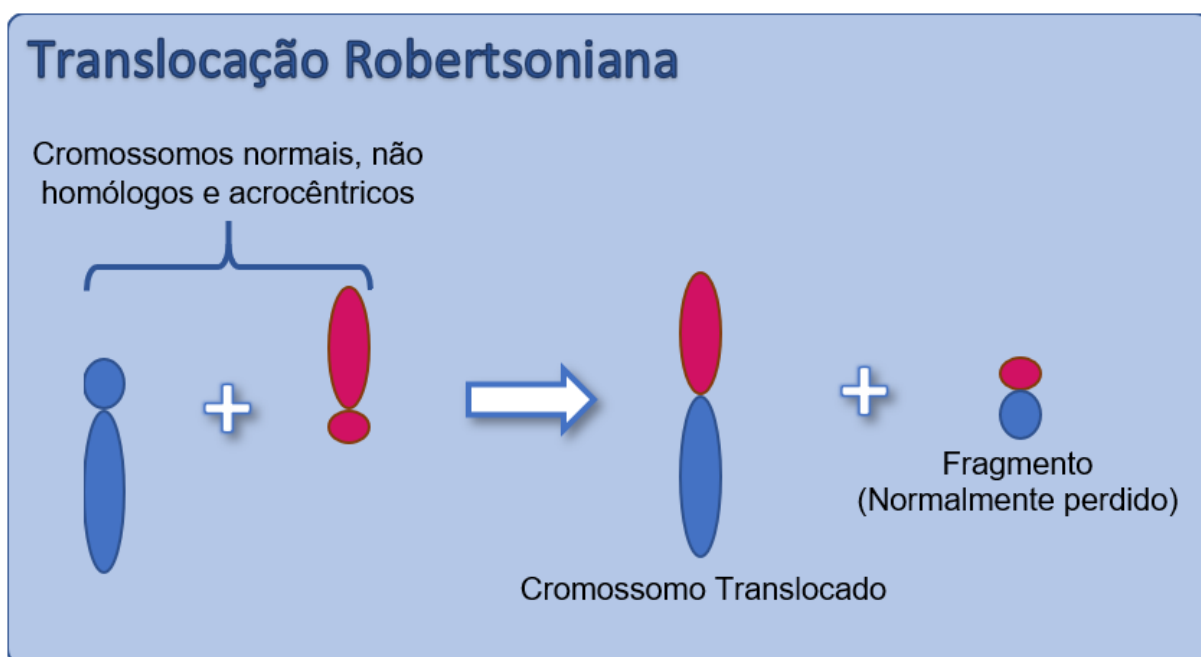


Figura 1. Esquematização de uma translocação robertsoniana. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador.

1.2.3 Trissomia em camundongos

Em meados da década de 70 do século passado, um grupo de pesquisadores liderados por Gropp, desenvolveram os primeiros camundongos aneuplóides¹¹, tornando-os precursores de modelos animais para a síndrome de Down.

Estes foram criados por meio da indução de Translocações Robertsonianas (TR) em roedores selvagens comuns (*Mus musculus*). Essa forma de rearranjo genético ocorre quando dois cromossomos não homólogos acrocêntricos se fundem formando um maior. O cruzamento desses animais, portadores de cromossomos translocados, com camundongos de laboratório, possibilita a geração, entre 20-40%, de filhotes trissômico¹². Em 1980,

pesquisadores desenvolveram um animal com a trissomia do cromossomo 16, chamado de Ts16, este viria a ser considerado o primeiro camundongo modelo de síndrome de Down, baseado nas similaridades patológicas típicas da desordem genética. Posteriormente, o mapeamento genético desses animais mostrou que muitos genes presentes no cromossomo 21 humano (HSA 21) estavam presentes no cromossomo 16 desses animais (MMU 16)¹². Dessa forma, o Ts16, foi amplamente utilizado como modelo animal para síndrome de Down, entretanto não podem ser utilizados como modelo de estudo pós-natal da doença já que estes não sobreviviam o pós-parto.

1.2.3.1 Ts65Dn

Um grupo de pesquisadores liderados por Davisson criou um camundongo trissômico segmental chamado de **Ts(17¹⁶)65Dn**, ou simplesmente Ts65Dn. Trata-se de um animal trissômico da maior parte do cromossomo 16 que contém genes homólogos do 21 da espécie humana. Este foi o primeiro modelo de aneuploidia para estudos pós-natal dos sistemas afetados pela SD. Hoje ainda é considerado o modelo mais amplamente estudado da referida doença e o mais completo quando se trata de exibição de fenótipos que mimetizam a anomalia genética^{12,66}. Este foi concebido por meio de recíprocas translocações produzidas nas células germinativas de camundongos machos por irradiação de célio diretamente nos testículos, sua descendência foi rastreada à procura de pequenas translocações contendo a parte final do cromossomo 16, finalmente, os animais que carregavam essas aberrações cromossômicas foram cruzados para determinar quais poderiam produzir animais que sobrevivessem a fase adulta. Esta característica possibilitou a abertura de novos horizontes na pesquisa da síndrome de Down, permitindo estudos relacionados com o envelhecimento, aprendizado e

memória, anormalidades neurológicas, desenvolvimento de neoplasias, cardiopatias congênitas além de déficits imunológicos pós-natais¹².

O fato de serem animais que sobrevivem o pós-parto possibilitou estudos mais aprofundados, então vários pesquisadores se empenharam em demonstrar características fenotípicas decorrentes da trissomia. Não muito tempo após, estudos foram sendo publicados a esse respeito. Hoje se sabe, por exemplo, que aproximadamente 20% dos Ts65Dn apresentam hidrocefalia e alguns exibem convulsões e tremores^{12,66}.

Os estudos relacionados a esses camundongos, em sua grande maioria, são direcionados ao sistema nervoso. Eles apresentam déficit de aprendizado e memória. Quando esses itens foram avaliados, os modelos tiveram um desempenho inferior que camundongos não trissômico. Igualmente, foram evidenciadas características comportamentais compatíveis com pessoas com síndrome de Down¹². No teste de labirinto de Morris, estes aprendem de forma mais lenta e nunca adquirem o mesmo nível de competência, além de, numa segunda bateria de testes, não apresentarem o mesmo grau de evocação^{12,15-17,66}.

Desde sua descoberta em 1993, houve um acréscimo significativo de estudos relacionados ao Ts65Dn, no sentido de entender melhor a fisiologia e a anatomia do desse modelo da síndrome de Down, buscando similaridades com a doença procurando entender melhor essa anomalia genética. Hoje, após 25 anos, muito já se sabe sobre o camundongo, que reconhecidamente apresenta déficits cognitivos, de memória, de aprendizado e comportamento¹⁵.

Ainda relacionado ao sistema nervoso, pesquisadores buscaram entender os mecanismos responsáveis pelo déficit de memória e aprendizado

nesses animais. Baseados em pesquisas relacionadas ao hipocampo e formas de plasticidade sináptica, como a depressão e a potenciação de longa duração (do inglês LTD e LTP respectivamente), uma vez que estão intimamente ligados a essa disfunção^{67,68}, sabe-se que esses modelos apresentam alterações importantes na indução de LTP no giro denteado e da região CA1¹⁸⁻²¹, além de estabelecerem que este fenômeno está relacionado a disfunção dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) desses animais²². Além de estudos mostrando a ação de medicamentos, como a memantina, no intuito de recuperar essas disfunções no hipocampo^{22,23}.

Mesmo que não existam pesquisas relacionadas às ações do sistema nervoso autônomo sobre o coração desses modelos, vários trabalhos já abordaram aspectos cardiovasculares. Estes apresentaram algum tipo de cardiopatia em uma quantidade significativa de camundongos, além de que uma parcela expressiva desses (37%) morreram dentro de 48 horas depois de nascidos comparados com pouco mais que 12% quando se trata dos controles²⁵.

Algumas anomalias cardiovasculares já foram identificadas nesses animais, incluindo arco aórtico direito com divertículo de Kommerell, tronco arterioso persistente, arco aórtico direito com lado direito do canal arterial e da artéria subclávia direita aberrante. O arco aórtico à direita e subclávia direita aberrante também foram identificados em vários camundongos Ts65Dn que sobreviveram até a idade adulta²⁵.

1.3 Fármacos com ação no sistema nervoso autônomo

1.3.1 Isoproterenol

Também conhecido como isoprenalina, é uma catecolamina sintética e um potente agonista não seletivo de receptores beta (β) e age sobre os subtipos β_1 , β_2 e β_3 sem distinção, entretanto tem uma afinidade muito baixa pelos receptores α -adrenérgicos⁶⁹. É principalmente utilizado no tratamento de bradicardia, “Torsade de Pointes” induzida por tioridazina e bloqueio cardíaco⁷⁰.

A maior desvantagem da terapia com isoproterenol é a sua habilidade de produzir radicais livres gerando estresse oxidativo o que leva a danos mitocondriais progressivos além de alterações de parâmetros bioquímicos cardíacos que, por consequência, ocasiona lesões nesse tecido. Este inconveniente, por vezes, é empregado em pesquisas experimentais com o intuito de gerar avarias no tecido cardíaco para testes farmacológicos posteriores⁷¹.

As ações sobre o sistema cardiovascular consistem na estimulação dos receptores β -adrenérgicos provocando diminuição acentuada da pressão arterial diastólica decorrente da vasodilatação mediada pelos receptores β_2 , isso ocorre devido ao relaxamento dos vasos sanguíneos no músculo esquelético bem como alguma vasodilatação adicional nos leitos vasculares renal e mesentérico⁶⁹.

1.3.2 Carbacol

É um éster sintético de colina bastante utilizado na oftalmologia, seus efeitos, miose e aumento do fluxo do humor aquoso, permitem que este seja aplicado em cirurgias de catarata, bem como, medicamento para controle de

pressão intraocular Trata-se de um agonista colinomimético que age nos receptores muscarínicos e nicotínicos e possui uma ação mais prolongada que a acetilcolina, já que não é afetado pelas colinesterases⁷².

Como ação cardíaca causa a diminuição da frequência cardíaca motivado pelo retardo da despolarização espontânea do nó sinoatrial (efeito cronotrópico negativo), além de redução da força de contração (efeito inotrópico negativo) da musculatura atrial e em menor extensão da ventricular⁷².

1.4 Modulação Autonômica Cardíaca

O sistema nervoso autônomo é uma parte do sistema nervoso central e do periférico com atividade independente do controle voluntário. Pode ser dividido em sistemas nervosos simpático e parassimpático (SNP), cujas atividades regulam a frequência cardíaca, a pressão arterial, a frequência respiratória etc.^{73,74}. O controle do sistema cardiovascular é parcialmente realizado pelo SNA, o qual fornece nervos aferentes e eferentes ao coração, na forma de terminações simpáticas por todo o miocárdio e parassimpáticas para o nódulo sinusal, o miocárdio atrial e o nódulo atrioventricular^{27,29}.

A partir das informações aferentes, por meio de uma complexa interação de estímulo e inibição, respostas das vias simpática e parassimpática são formuladas e modificam a FC, adaptando-a as necessidades de cada momento^{27,29}. A ativação do sistema nervoso simpático, por exemplo, aumenta a pressão arterial e acelera a FC. O sistema nervoso parassimpático é o oposto, sua ativação pode reduzir PA e FC^{29,73}.

Uma das formas de avaliar a modulação autonômica é a variabilidade da frequência cardíaca, que descreve as oscilações nos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos relacionadas às influências do sistema nervoso autônomo sobre o nódulo sinusal, fornecendo índices que representam a atuação dos ramos simpático e parassimpático sobre o coração^{27,74}.

Mudanças nos padrões da VFC fornecem um indicador sensível e antecipado de comprometimentos na saúde. Geralmente, alta VFC é sinal de boa adaptação, caracterizando um indivíduo saudável com mecanismos autonômicos eficientes. Inversamente, baixa VFC é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, o que pode indicar a presença de mau funcionamento fisiológico no indivíduo, necessitando de investigações adicionais de modo a encontrar um diagnóstico específico^{74,75}.

Realizada a captação do sinal, este deve ser transferido para o computador, por meio de uma interface do próprio equipamento, e seus dados filtrados, uma vez que a presença de batimentos ectópicos prematuros ou artefatos interfere na análise da variabilidade, comprometendo a confiabilidade dos índices extraídos da série temporal^{76,77,78}.

Esse processo de filtragem nem sempre é mencionado nos artigos científicos, porém sabe-se que são hábeis para detectar e corrigir intervalos RR anormais. Um exemplo de método de filtragem é o proposto Godoy *et al.*⁷⁶, no qual, após a coleta dos intervalos RR, filtraram a série temporal em duas etapas: uma digital por meio do próprio software do equipamento e outro manual, caracterizada pela inspeção visual dos intervalos RR e exclusão de intervalos anormais. Os

autores⁷⁶, propõem também que haja um limite de erro, uma quantidade máxima admitida para elegerem as séries que serão analisadas, 5%.

A variabilidade da frequência cardíaca pode ser analisada utilizando-se métodos lineares, no domínio do tempo e da frequência, e não lineares, no domínio do caos^{27,29}.

Na análise da VFC no domínio do tempo, os resultados são apresentados em unidade de tempo (milissegundos). Cada intervalo RR normal é medido durante determinado intervalo de tempo e, a partir de métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos RR), calculam-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos^{27,29} (**figura 2**).

Análise no domínio do tempo: índices estatísticos	
SDNN (ms)	Desvio padrão de todos os intervalos RR normais
RMSSD (ms)	Raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes

Figura 2: Índices estatísticos de variabilidade da frequência cardíaca utilizados no trabalho. Fonte: arquivo pessoal.

O índice SDNN é obtido a partir de registros de longa duração e representam as atividades simpática e parassimpática, porém não permite distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à retirada do tônus vagal^{27,74}.

Já o índice RMSSD representa a atividade parassimpática, pois é encontrado a partir da análise de intervalos RR adjacentes^{27,29,74}.

Outra possibilidade de processar intervalos RR no domínio do tempo é a partir de métodos geométricos, sendo os mais conhecidos o índice triangular (RRtri) e o gráfico de Poincaré (também conhecido como plotagem de Lorenz). Os métodos geométricos apresentam os intervalos RR em padrões geométricos e várias aproximações são usadas para derivar as medidas de VFC a partir delas^{79,80} (**figura 3**).

Análise no domínio do tempo: índices geométricos	
RRTri	Índice triangular
SD1	Desvio padrão da variabilidade instantânea batimento a batimento
SD2	Desvio padrão em longo prazo dos intervalos RR contínuos
SD1/SD2	Razão entre as variações curta e longa dos intervalos RR

Figura 3: Índices geométricos de variabilidade da frequência cardíaca. Fonte: arquivo pessoal.

O índice triangular (correspondente à base do triângulo) pode ser calculado dividindo-se a área (correspondente ao número total de intervalos RR utilizados para construir a figura) e a altura (correspondente ao número de intervalos RR com frequência modal) do triângulo^{27,29,79}. Este índice tem uma íntima correlação com o desvio padrão de todos os intervalos RR e não sofre a influência dos batimentos ectópicos e artefatos, pois eles ficam fora do triângulo⁷⁴.

O gráfico de Poincaré é um método geométrico para análise da dinâmica da VFC, que representa uma série temporal dentro de um plano cartesiano, no qual cada intervalo RR é correlacionado com o intervalo seguinte e

definem um ponto no gráfico^{79,80}. Este índice é considerado por alguns autores como não linear²⁷.

A análise do gráfico de Poincaré pode ser feita de forma qualitativa (visual), por meio da avaliação da figura formada pelo seu atrator, a qual é útil para mostrar o grau de complexidade dos intervalos RR (Task force 1996); ou quantitativa, por meio do ajuste da elipse da figura formada pelo atrator, de onde se obtém três índices: SD1, SD2 e a razão SD1/SD2^{79,80} (**figura 4**).

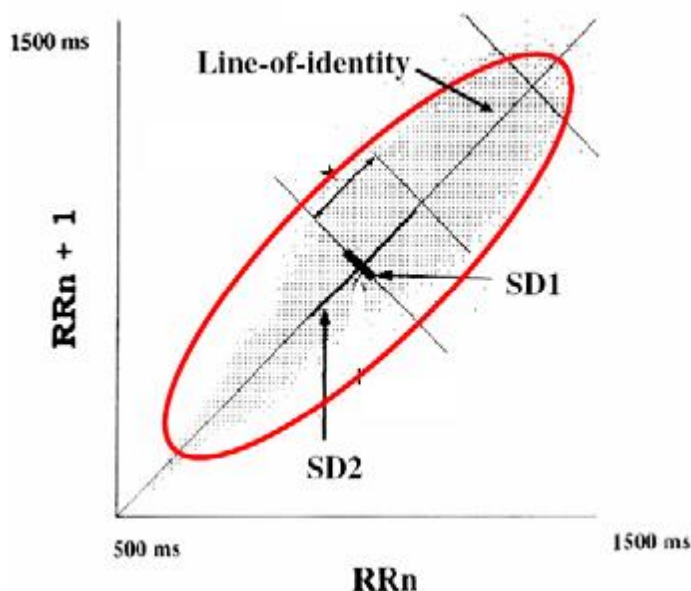


Figura 4: Cálculo dos índices SD1 e SD2 do gráfico de Poincaré. Fonte: Arquivo pessoal.

Por atrator, entende-se o local do espaço de fase que apresenta alta probabilidade para representação da trajetória e é determinado por uma série de parâmetros controladores externos e internos⁸¹.

O SD1 representa a dispersão dos pontos perpendiculares à linha de identidade e parece ser um índice de registro instantâneo da variabilidade batimento a batimento; o SD2 representa a dispersão dos pontos ao longo da linha de identidade e representa a VFC em registros de longa duração; e o SD1/SD2 mostra a razão entre as variações curta e longa dos intervalos RR^{27,80}.

2 OBJETIVOS

Caracterizar a modulação autonômica cardíaca em camundongos Ts65Dn sob efeito de agonistas adrenérgicos e colinérgicos.

3. MÉTODO

3.1 *Desenho do Estudo*

Trata-se de um estudo longitudinal e descritivo, realizado no laboratório do Professor Alberto Costa no departamento de Pediatria da Universidade Case Western Reserve, em Cleveland – Ohio – EUA.

Os dados do projeto foram coletados durante o período de doutorado sanduíche no exterior fomentado pela Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). A coleta de dados cardiológicos foi realizada por intermédio do *Mouserack*, um dispositivo de características não invasivas, e posteriormente utilizada para a análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC).

3.2 *Aspectos Éticos*

A pesquisa foi realizada de acordo com as regras dos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos (National Institutes of Health) após aprovação pelo Comitê de Ética para Pesquisas Animais (Institutional Animal Care and Use Committee) da Universidade Case Western Reserve, com número de protocolo 2016-0013, vide Anexo I.

As informações ficarão sob a guarda e responsabilidade do pesquisador e seu co-orientador nos Estados Unidos. Os dados serão divulgados em forma de relatórios e comunicações científicas.

3.3 Animais

Foram considerados 10 animais Ts65Dn e 10 controles todos machos e adultos com idades entre 6 e 9 meses (adquiridos do The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME).

Os procedimentos foram realizados nos laboratórios do Centro de Recursos Animais (ARC – Animal Resource Center) da Universidade Case Western Reserve em Cleveland, Ohio nos Estados Unidos da América, em salas com temperatura ambiente (22 °C).

Os camundongos foram alojados em conjunto com companheiros de ninhada, com acesso *ad libitum* a comida e água, em temperatura ambiente normal, em um ciclo claro-escuro de 12: 12h (luzes acesas às 6 horas da manhã). As gravações foram realizadas durante o dia com as luzes acesas e sem acesso a comida ou água durante as gravações de duas horas.

3.4 Protocolo de registro eletrofisiológico

Foram determinadas as funções cardíacas desses animais por intermédio do *Mouserack* (detalhes na seção 3.5), um método não invasivo que consiste em uma grade de eletrodos presos à uma câmara de contenção colocados dentro de uma gaiola simples para camundongos (**figura 5**).

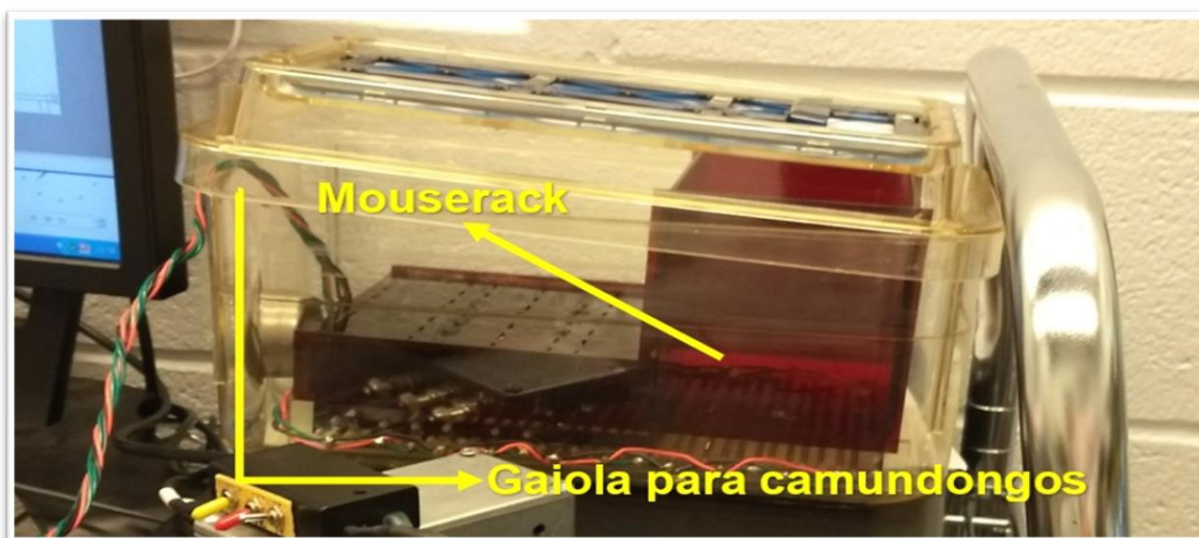


Figura 5. Foto mostrando o Mouserack dentro de uma gaiola comum para camundongos. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador

Os camundongos permaneceram dentro de suas gaiolas rotineiras com outros animais e acesso livre a comida e bebida. Para iniciar a sessão de registro eletrofisiológico, os camundongos foram retirados de suas gaiolas rotineiras e colocados em uma segunda gaiola limpa contendo o MouseRack. Estes foram deixados lá por alguns minutos para que se acostumassem com o ambiente e então, o equipamento foi ligado para iniciar o registro eletrofisiológico de repouso por 30 minutos. A figura a seguir (**figura 6**) esquematiza o posicionamento da grade de eletrodos na câmara de contenção e a colocação dos camundongos.

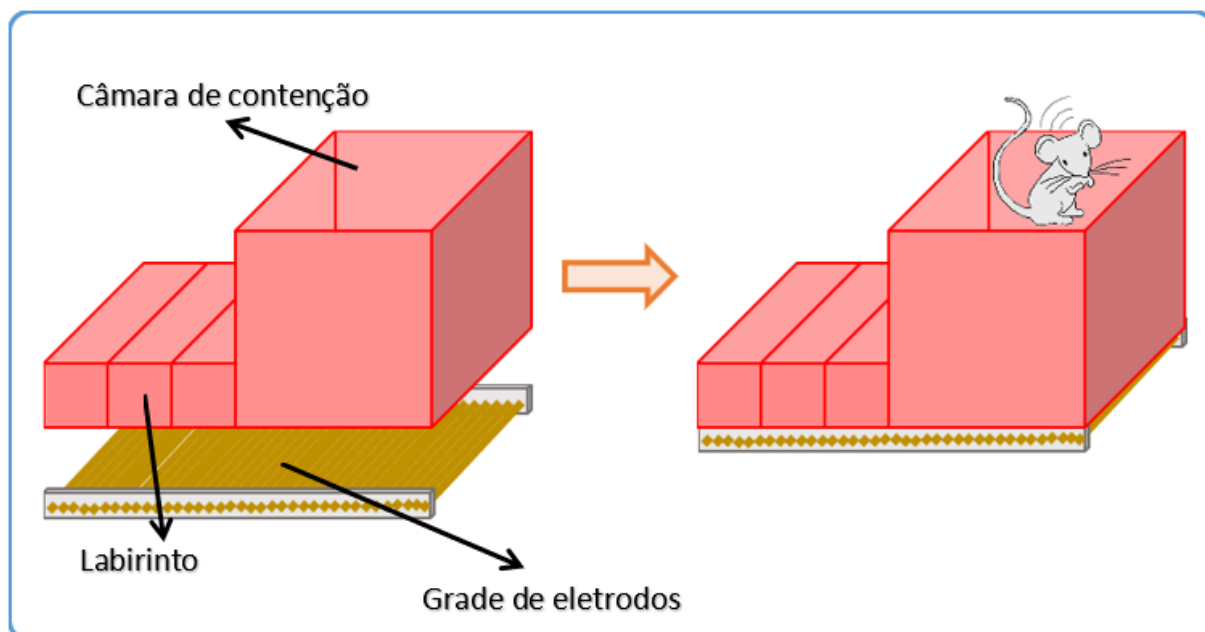


Figura 6. Esquemática do posicionamento da grade de eletrodos na câmara de contenção e a colocação do camundongo para a gravação dos dados no MouseRack. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador

Após a primeira meia hora, os camundongos foram retirados para a injeção do fármaco pré-selecionado de forma aleatória e colocados de volta na área de registro eletrofisiológico. Terminado o período de 90 minutos os animais foram colocados de volta em suas gaiolas rotineiras e levados de volta ao biotério. A **figura 7** mostra a esquematização do protocolo de gravação do Mouserack.

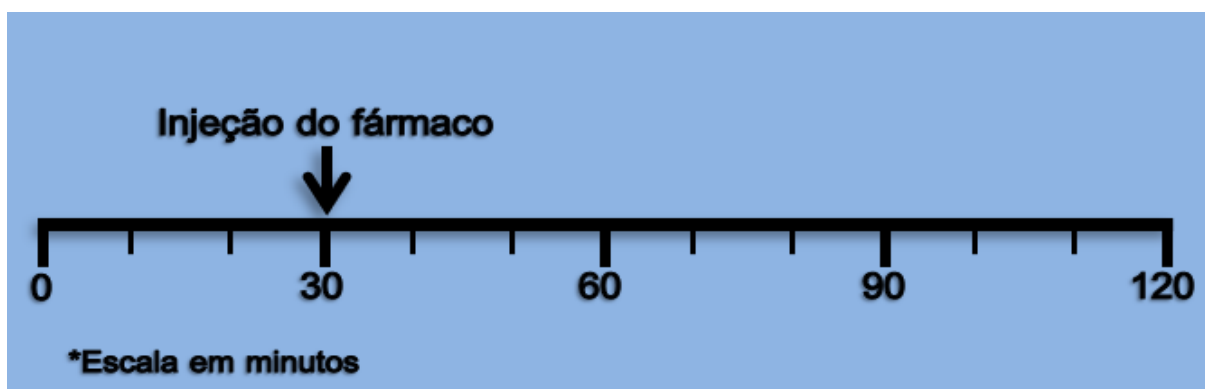


Figura 7. Esquemática do protocolo de coleta de dados. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador.

No dia seguinte, foi repetido o mesmo protocolo para o uso do segundo fármaco. A decisão de aplicação de apenas um medicamento por dia foi feita para que os camundongos tivessem um tempo razoável entre as injeções dos dois fármacos, minimizando interferências entre eles e, também, o desgaste desnecessário nos animais.

3.5 Gravação dos dados cardiológicos por meio do MouseRack

Trata-se de um dispositivo desenvolvido por Mark Johnson, um pesquisador com doutorado em engenharia biomédica em atividade no Laboratório do professor Alberto Costa, no departamento de pediatria da Universidade Case Western Reserve. Consiste, como o próprio nome faz referência, numa grade de eletrodos de latão (**figura 8**), e uma câmara de contenção que se encaixa na base de eletrodos mantendo os animais sobre a área de gravação de dados.

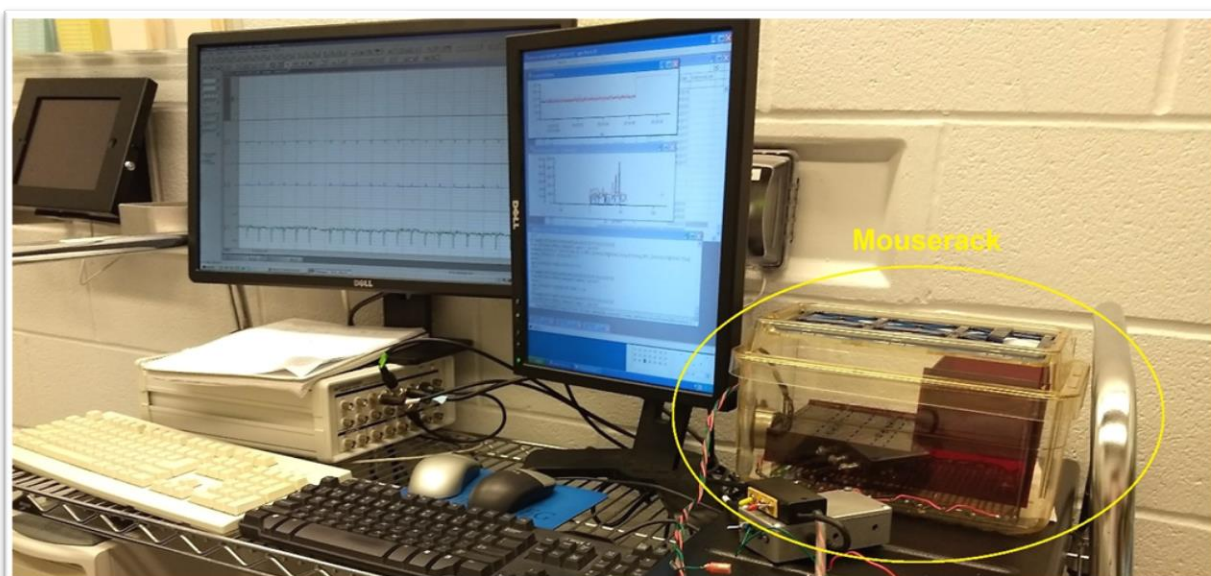


Figura 8. Foto mostrando o Mouserack disposto dentro de uma gaiola normal para camundongos. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador.

É um dispositivo composto por 35 eletrodos dispostos paralelamente entre si, estes estão interligados em conjunto formando três grupos distintos, dois de registro e um para aterramento. O esquema a seguir (**figura 9**) mostra de forma mais simples a disposição dos eletrodos, os de mesma cor estão interligados formando um só eletrodo, porém colocado em regiões diferentes da grade impedindo que o camundongo coloque duas patas no mesmo eletrodo.

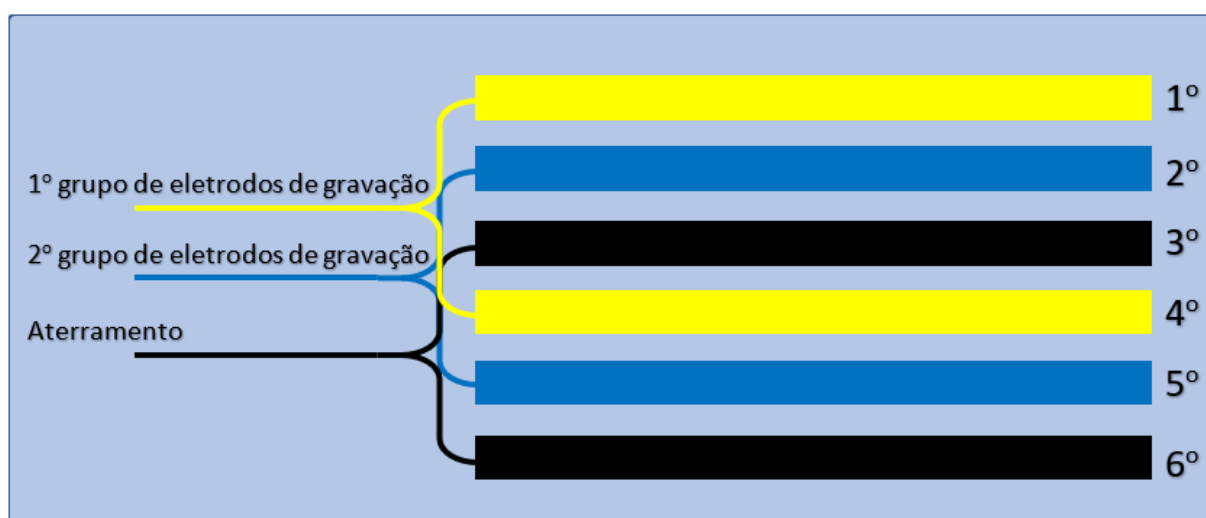


Figura 9. Esquemática do MouseRack, exemplificando a configuração dos eletrodos de registro e de aterramento. Fonte: arquivo pessoal do pesquisador.

Os dados cardiológicos dos camundongos, em forma de sinal elétrico analógico, são captados pelo equipamento e então convertidos para sinais digitais por meio do conversor análogo-digital Digidata 1322A (Molecular Devices, LLC., San Jose, CA – USA) e, então apresentados no monitor.

Após a captação destes, os dados foram então trabalhados por algoritmos elaborados pelo pesquisador Mark Johnson, por meio do software Igor Pro (WaveMetrics, Inc. Portland, Oregon – USA), de forma a eliminar artefatos e calcular os possíveis batimentos perdidos em decorrência destes.

Por fim, os batimentos foram então extraídos pelo software e calculados os intervalos RR utilizados posteriormente para análise da variabilidade da frequência cardíaca.

3.6 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

A análise da variabilidade da frequência cardíaca foi realizada por intermédio de índices lineares, obtidos pelo software MATLAB and Statistics Toolbox Release 2014a The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, USA.

3.6.1 Índices lineares

Foram utilizados, nesse trabalho, os índices lineares no **domínio do tempo**, realizada por meio de índices estatísticos e geométricos, é assim denominada por expressar os dados em unidade de tempo (milissegundos), e estão descritos a seguir.

3.6.1.1 Índices estatísticos

Os índices estatísticos avaliados foram: RMSSD, pNN50 e SDNN.

O índice RMSSD é definido conforme apresentado na equação a seguir:

$$RMSSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N-1} (RR_i - RR_{i+1})^2}{N - 1}}$$

O SDNN (figura 10), reflete a participação de ambos os ramos do SNA e representa o desvio padrão da média de todos os intervalos RR normais, expresso em milissegundos^{27,29,73,74}.

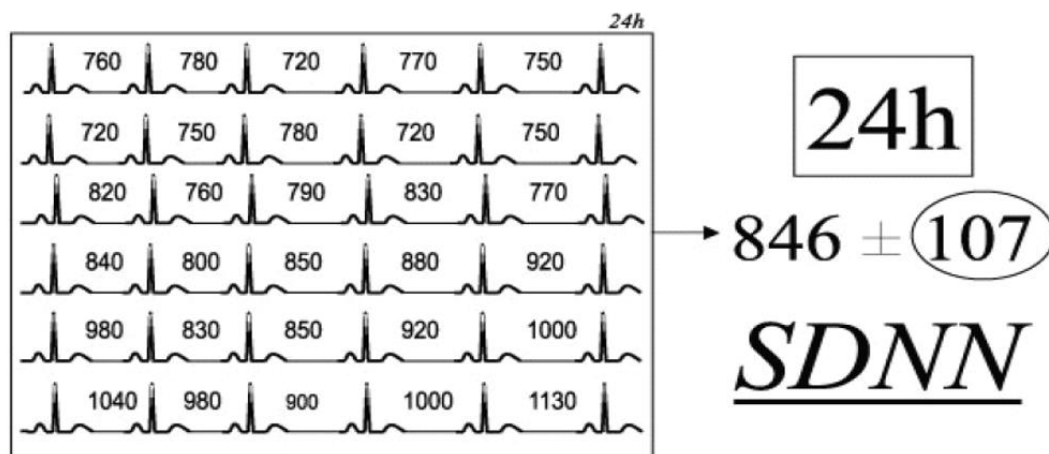


Figura 10: Cálculo do SDNN. Fonte: Rassi Júnior⁸²

3.6.1.2 Índices geométricos

Foram analisados os seguintes índices geométricos: RRtri, SD1, SD2 e a relação SD1/SD2^{27,29,79,80}.

O índice triangular (RRtri) é calculado a partir da construção de um histograma de densidade dos intervalos RR normais, o qual mostra, no eixo x (abscissa), o comprimento dos intervalos RR e, no eixo y (ordenada), a frequência com que cada um deles ocorreu. A união dos pontos das colunas do histograma forma uma figura semelhante a um triângulo e a largura da base deste triângulo expressa a variabilidade dos intervalos RR. O índice triangular (correspondente à base do triângulo) pode ser calculado dividindo-se a área (corresponde ao número total de intervalos RR utilizados para construir a figura) e a altura (corresponde ao número de intervalos RR com frequência modal) do triângulo (figura 11)^{27,79,80}.

3.7 Análise Estatística

Foram consideradas como variáveis dependentes os índices do domínio do tempo e da frequência (MeanRR, SDNN, RMSSD, SD1, SD2, SD1/SD2). As variáveis dependentes foram submetidas à análise de histograma com curva de normalidade para atestar a normalidade dos dados. Foi então realizada análise múltipla de variâncias (MANOVA) com análise intergrupo (Grupos: Ts65Dn e Controles) e medidas repetidas no fator intragrupo (Momentos: 5', 10', 20' e 30'). Eta squared parcial foi utilizado para calcular o tamanho do efeito, onde valores acima de 0,01 foram considerados pequenos efeitos, acima de 0,06, efeitos moderados e, acima de 0,14, efeitos grandes. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significante. O pacote estatístico utilizado foi o Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (SPSS; IBM, Chicago, Illinois, EUA), versão 20.0.

4 RESULTADOS

Para este estudo foram considerados 20 camundongos machos e adultos, sendo eles 10 trissômicos modelos da síndrome de Down (Ts65Dn) e 10 controles, que consistem em animais da mesma linhagem, porém sem a anomalia cromossômica.

Assim, são apresentados os valores de média e desvio padrão dos animais acima mencionados.

Na tabela 1, são apresentados os índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de Isoproterenol. Quando analisado os dois grupos houve diferença estatisticamente significativa no índice MeanRR, apresentando valores menores no grupo Ts65Dn em relação ao grupo controle. Já, com relação a análise entre os diferentes períodos, foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos seguintes índices: MeanRR e RMSSD. Por fim, quando analisadas as interações entre as variáveis grupo e período, houve diferenças estatisticamente significantes somente no índice MeanRR.

Tabela 1: Média e desvio padrão dos índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de isoproterenol. São Paulo, SP, Brasil, 2019.

Animais	Período	MeanRR	RMSSD	SDNN
Controle	Repouso	84,13 (4,95)	5,49 (1,79)	7,13 (3,06)
	0' - 5'	80,77 (1,54)	4,76 (2,05)	3,31 (1,17)
	5' - 10'	83,29 (1,83)	3,90 (1,00)	2,54 (0,61) ^a
	10' - 20'	84,42 (2,22)	3,74 (0,92)	2,46 (0,70) ^a
	20' - 30'	83,80 (2,41)	4,36 (1,09)	2,87 (0,72) ^a
Ts65Dn	Repouso	80,82 (5,43)	5,75 (3,79)	6,49 (2,95)
	0' - 5'	83,25 (3,19)	4,60 (2,75)	4,70 (3,55)
	5' - 10'	88,13 (4,69)	5,50 (3,25)	5,42 (3,76) ^a
	10' - 20'	92,01 (6,73) ^{#,a,b}	5,09 (3,23)	5,16 (4,10)
	20' - 30'	90,65 (6,95) ^{#,a,b}	4,86 (4,32)	4,54 (4,65)
Grupo p		0,005*	0,372	0,0567
Período p		<0,001*	0,4453	0,009*
Interação (grupo e período) p		0,007*	0,6706	0,2318

*significância teste de anova para medidas repetidas duas vias; Pós-hoc Tukey: a significância com momento 0; b significância com momento 1; c significância com momento 2; d significância com momento 3. #Significância segundo grupo por momento; ms: milissegundos; DP: desvio padrão; MeanRR: média dos intervalos RR; RMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes; SDNN: Desvio padrão de todos os intervalos RR normais.

A tabela 2 apresenta os índices geométricos de variabilidade da frequência cardíaca dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de Isoproterenol. A análise entre os dois grupos estudados mostrou diferenças estatisticamente significativas nos índices SD2 e na razão SD1/SD2, o primeiro apresentou valores menores no grupo controle, com exceção ao período repouso (pré inoculação do fármaco), quando o índice foi menor no grupo dos animais modelos da SD, mostrando uma queda abrupta do índice após a injeção do medicamento no grupo controle. Quando se trata da razão SD1/SD2, o grupo Ts65Dn apresentou valores menores quando comparados ao grupo controle. Os mesmos índices (SD2 e a razão SD1/SD2) apresentaram relevância estatística na análise intra grupo. Já a análise da interação das variáveis grupo e período não apresentou dados estatisticamente significantes.

Tabela 2: Média e desvio padrão dos índices geométricos de variabilidade da frequência cardíaca dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de isoproterenol. São Paulo, SP, Brasil, 2019.

Animal	Período	RRTri	SD1	SD2	SD1/SD2
Controle	Repouso	0,16 (0,26)	3,29 (1,07)	9,29 (4,48)	0,43 (0,23)
	0' - 5'	0,11 (0,07)	2,92 (1,38)	3,65 (0,90)	0,77 (0,23) ^a
	5' - 10'	0,06 (0,04)	2,33 (0,71)	2,76 (0,65) ^a	0,84 (0,12) ^a
	10' - 20'	0,02 (0,01)	2,25 (0,64)	2,43 (0,79) ^a	0,94 (0,19) ^a
	20' - 30'	0,03 (0,03)	2,56 (0,71)	2,84 (0,73) ^a	0,90 (0,12) ^a
Ts65Dn	Repouso	0,35 (0,53)	3,54 (2,00)	8,34 (3,92)	0,47 (0,22)
	0' - 5'	1,04 (2,09)	2,79 (1,65)	6,51 (4,72)	0,51 (0,30)
	5' - 10'	0,33 (0,86)	3,25 (1,91)	6,81 (5,06)	0,59 (0,27)
	10' - 20'	0,04 (0,06)	2,99 (1,88)	6,36 (5,40)	0,59 (0,24) [#]
	20' - 30'	0,07 (0,14)	2,88 (2,54)	5,52 (5,86)	0,60 (0,21)
Grupo p		0,1485	0,3936	0,026*	0,003*
Período p		0,091	0,7224	0,004*	<0,001*
Interação (grupo e período) p		0,2002	0,3341	0,1913	0,0236

*significância teste de anova para medidas repetidas duas vias; Pós-hoc Tukey: a significância com momento 0; b significância com momento 1; c significância com momento 2; d significância com momento 3. #Significância segundo grupo por momento; DP: desvio padrão; RRTri: índice triangular; SD1: desvio padrão da variabilidade instantânea batimento a batimento; SD2: desvio padrão em longo prazo dos intervalos RR contínuos.

A figura 13, apresenta os gráficos de análise da variabilidade da frequência cardíaca, índices no domínio do tempo (A1, A2 e A3) e geométricos (B1, B2, B3 e B4) sob efeito de isoproterenol.

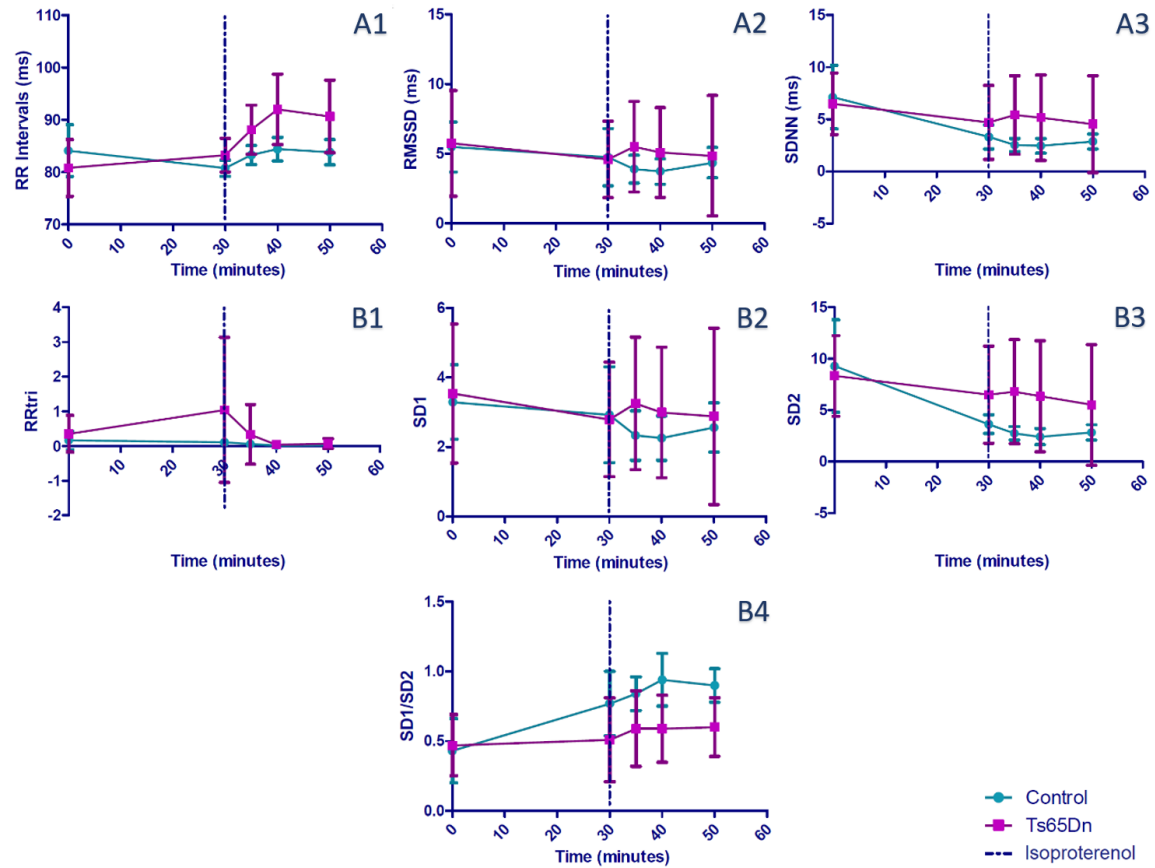


Figura 13: Índices da Variabilidade da frequência cardíaca, no domínio do tempo (A1, A2 e A3) e geométricos (B1, B2, B3 e B4) dos camundongos Ts65Dn e controle sob efeito de isoproterenol. Fonte: arquivo do pesquisador.

A tabela 3 apresenta a análise dos índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de carbacol. Houve diferença estatisticamente significativa no índice pNN50, o grupo Ts65Dn apresentou valores menores comparados com o grupo controle. Já na análise dos vários períodos, todos os índices (MeanRR, RMSSD, pNN50 e SDNN) apresentaram diferenças estatisticamente relevantes. O mesmo não foi observado na avaliação da interação das variáveis grupo e período, onde não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Ts65Dn e controle.

Tabela 3: Média e desvio padrão dos índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de carbacol. São Paulo, SP, Brasil, 2019.

Animal	Período	MeanRR	RMSSD	SDNN
Controle	Repouso	83,06 (3,41)	5,63 (1,53)	6,46 (2,58)
	0' - 5'	127,25 (22,60) ^a	9,37 (7,29)	22,04 (11,59) ^a
	5' - 10'	148,91 (29,81) ^a	11,62 (7,73)	11,14 (8,88) ^b
	10' - 20'	102,92 (13,24) ^c	7,68 (5,25)	16,23 (9,81)
	20' - 30'	86,24 (4,11) ^{b,c}	3,70 (1,28)	3,10 (0,99) ^{b,d}
Ts65Dn	Repouso	80,34 (3,22)	6,07 (5,04)	6,16 (3,09)
	0' - 5'	122,17 (22,89) ^a	11,32 (8,44)	18,69 (7,59) ^a
	5' - 10'	134,73 (21,51) ^a	13,53 (11,72)	12,31 (8,41)
	10' - 20'	96,22 (8,77) ^{b,c}	4,54 (1,91) ^c	10,88 (7,20)
	20' - 30'	84,43 (3,30) ^{b,c}	3,18 (0,98) ^c	2,68 (0,50) ^b
	Grupo p	0,2256	0,9459	0,4546
	Período p	<0,001*	<0,001*	<0,001*
	Interação (grupo e período) p	0,6356	0,4411	0,4032

*significância teste de anova para medidas repetidas duas vias; Pós-hoc Tukey: a significância com momento 0; b significância com momento 1; c significância com momento 2; d significância com momento 3. #Significância segundo grupo por momento; ms: milissegundos; DP: desvio padrão; MeanRR: média dos intervalos RR; RMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes; SDNN: Desvio padrão de todos os intervalos RR normais.

A tabela 4 apresenta os índices geométricos de variabilidade da frequência cardíaca dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de carbacol. Na análise intergrupos não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nesses índices. Já na análise intragrupos, houve diferenças estatisticamente significantes nos índices RRtri, SD1, SD2 e na razão SD1/SD2. Por fim, a análise da interação das variáveis grupo e período não apresentou diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 4: Média e desvio padrão dos índices geométricos de variabilidade da frequência cardíaca dos animais Ts65Dn e controles, sob efeito de carbacol. São Paulo, SP, Brasil, 2019.

Animal	Período	RRTri	SD1	SD2	SD1/SD2
Controle	Repouso	0,14 (0,21)	3,44 (0,99)	8,29 (3,66)	0,45 (0,15)
	0' - 5'	0,23 (0,20)	5,30 (4,20)	30,26 (16,04)	0,18 (0,10) ^a
	5' - 10'	0,24 (0,12)	6,50 (5,13)	13,83 (11,45) ^b	0,51 (0,17) ^b
	10' - 20'	0,05 (0,02) ^c	4,71 (3,48)	22,20 (13,61) ^a	0,25 (0,12) ^c
	20' - 30'	0,03 (0,02) ^c	2,26 (0,83)	3,62 (1,28) ^{b,d}	0,65 (0,18) ^{b,d}
Ts65Dn	Repouso	0,22 (0,22)	3,81 (3,36)	7,71 (2,95)	0,46 (0,22)
	0' - 5'	0,40 (0,28)	6,15 (4,63)	25,00 (9,83) ^a	0,26 (0,14)
	5' - 10'	0,45 (0,50)	7,36 (5,89)	15,02 (8,62)	0,46 (0,22) ^b
	10' - 20'	0,12 (0,12) ^c	2,82 (1,12)	15,08 (10,21)	0,26 (0,16)
	20' - 30'	0,17 (0,40) ^c	1,98 (0,67) ^c	3,35 (0,60) ^b	0,61 (0,21) ^{b,d}
Grupo		0,088	0,9872	0,3956	0,9846
p					
Período		0,004*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
p					
Interação					
(grupo e período)		0,8332	0,5517	0,3895	0,7078
p					

*significância teste de anova para medidas repetidas duas vias; Pós-hoc Tukey: a significância com momento 0; b significância com momento 1; c significância com momento 2; d significância com momento 3. #Significância segundo grupo por momento; DP: desvio padrão; RRTri: índice triangular; SD1: desvio padrão da variabilidade instantânea batimento a batimento; SD2: desvio padrão em longo prazo dos intervalos RR contínuos.

A figura 14, apresenta os gráficos de análise da variabilidade da frequência cardíaca, índices no domínio do tempo (A1, A2 e A3) e geométricos (B1, B2, B3 e B4) sob efeito de carbachol.

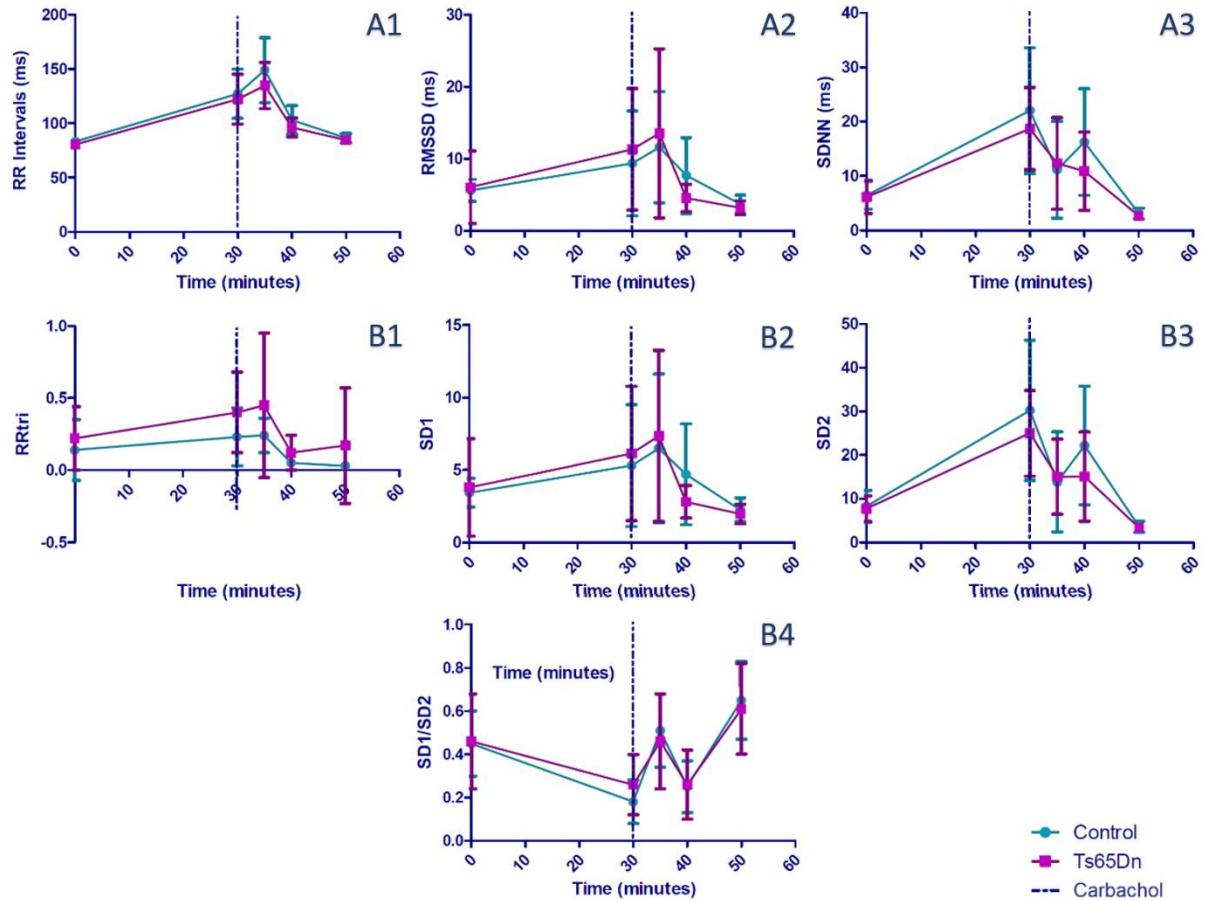


Figura 14: Índices da Variabilidade da frequência cardíaca, no domínio do tempo (A1, A2 e A3) e geométricos (B1, B2, B3 e B4) dos camundongos Ts65Dn e controle sob efeito de carbachol. Fonte: arquivo do pesquisador.

A figura 15 apresenta o plot de Poincaré de um camundongo Ts65Dn e de um controle sob o efeito de isoproterenol.

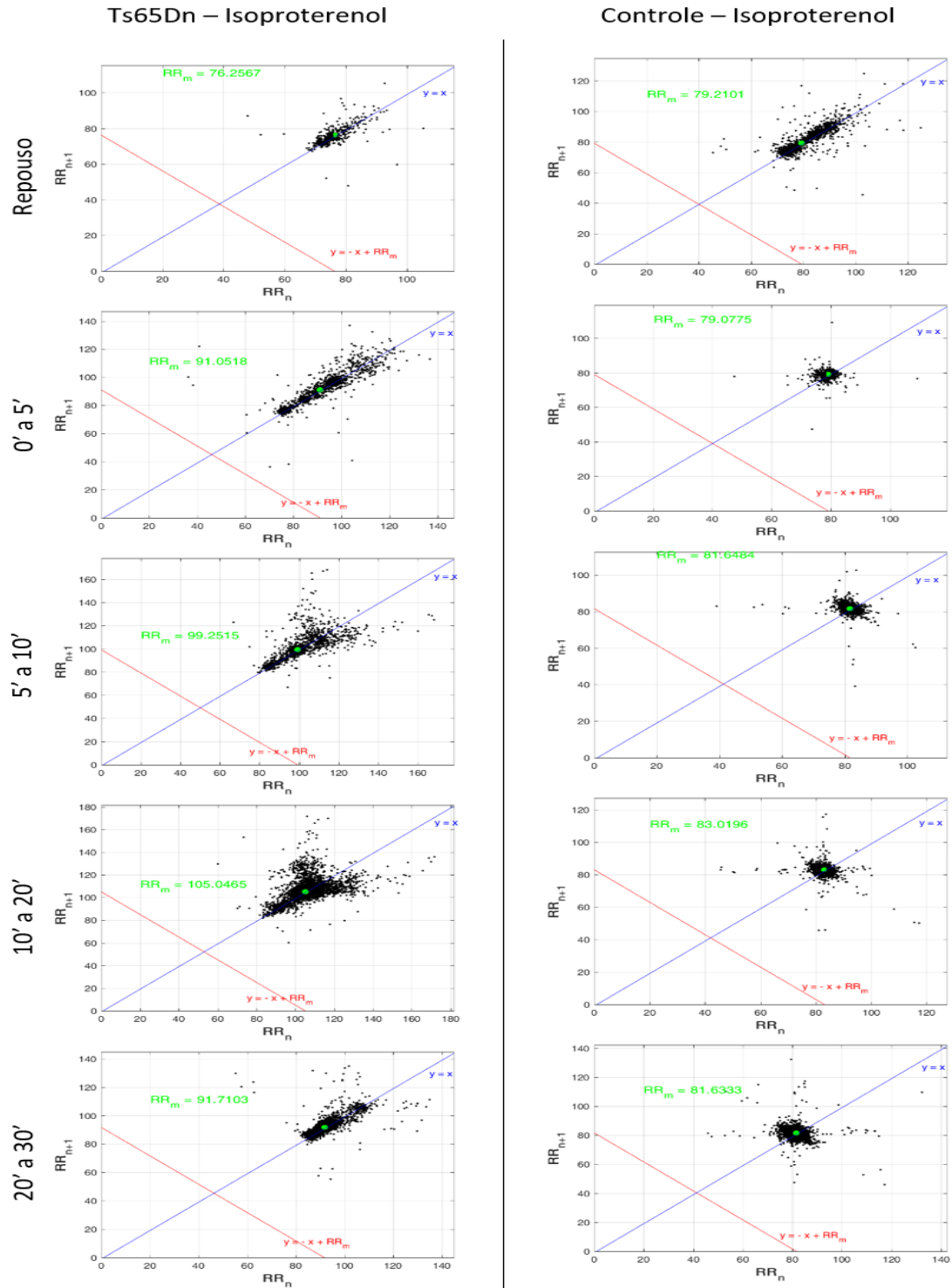


Figura 15: Análise do plot de Poincaré de camundongos Ts65Dn e controle sob efeito de isoproterenol. Fonte: arquivo do pesquisador.

A figura 16 apresenta o plot de Poincaré de um camundongo Ts65Dn e de um controle sob o efeito de carbacol.

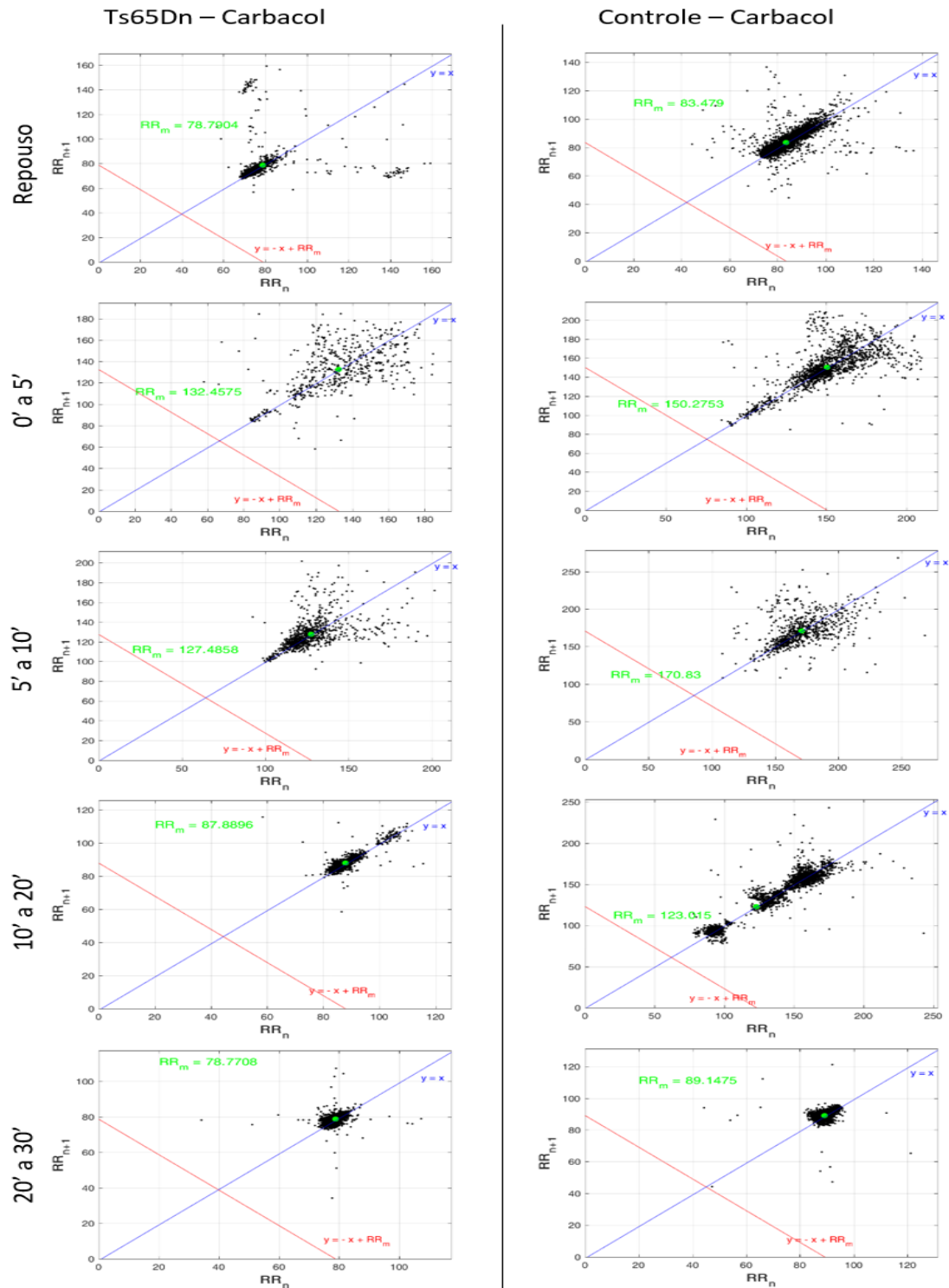


Figura 16: Análise do plot de Poincaré de camundongos Ts65Dn e controle sob efeito de carbacol. Fonte: arquivo do pesquisador.

Os gráficos de todos os animais participantes desse trabalho podem ser visibilizados no apêndice B.

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo acompanhou a variabilidade da frequência cardíaca de camundongos modelos da síndrome de Down (SD), Ts65Dn, bem como de animais controle, sob efeito de um agonista adrenérgico e um colinérgico. Baseado em estudos recentes relacionando a VFC à várias patologias^{83,84,85} e em particular a SD⁴⁰, nossa hipótese inicial era de que os animais modelos apresentariam déficit de modulação autonômica quando comparados com o grupo controle.

Um dos principais achados desta análise, se relacionam ao índice SD2. Este representa a modulação global da frequência cardíaca. Quando analisados antes da aplicação dos agentes farmacológicos, o índice SD2 (tabela 2) foi menor no grupo Ts65Dn em relação ao grupo controle. Em adição, observamos uma queda altamente significativa deste índice no grupo controle em relação ao experimental após aplicação de isoproterenol. Tais achados corroboram estudos anteriores, que demonstram déficit autonômico cardíaco em pessoas com a síndrome de Down³⁹, além de endossar nossa hipótese inicial.

A análise dos índices no domínio do tempo (tabela 1) apontou diferenças estatisticamente significantes da média dos batimentos cardíacos desses animais (MeanRR), com valores maiores para o grupo controle em repouso, indicando que a frequência cardíaca em camundongos Ts65Dn durante a análise estava ligeiramente mais baixa quando comparada com o grupo experimental. Entretanto após a administração do agonista adrenérgico, houve aumento gradativo da média dos intervalos entre batimentos ao longo do tempo dos camundongos Ts65Dn, o que significaria diminuição da frequência cardíaca em tais animais. No

grupo controle observou-se o oposto (e farmacologicamente esperado), i.e., um aumento da frequência cardíaca.

O índice RMSSD em repouso, representante da modulação vagal^{27,29,73,74}, mostrou valores maiores para o grupo Ts65Dn, sugerindo que estes animais tendem a ter melhor modulação parassimpática que o grupo controle. Estes dados corroboram trabalhos anteriores com pessoas com SD^{86,87}, as quais, em repouso, apresentaram valores maiores deste índice em comparação com indivíduos sem SD. Após a administração do agonista adrenérgico os dois grupos de camundongos mostraram queda do índice RMSSD, o que também reflete os dados reportados nos trabalhos de Baynard e colaboradores⁸⁷, bem como Fernhall e colaboradores⁸⁶ em seres humanos com e sem SD.

Na mesma tabela, um dos índices que representa a modulação global da frequência cardíaca^{27,29}, o SDNN, mostrou um déficit da VFC no grupo experimental quando comparado ao controle no momento repouso (M0). Mesmo que os resultados não tenham sido estatisticamente significantes, estiveram próximos do valor pré-estabelecido de “p”. Outra observação com relação a este índice, foi o efeito do agonista adrenérgico: após a aplicação do mesmo, houve queda dos valores de SDNN, contudo, o grupo controle apresentou queda mais expressiva que o grupo experimental.

O índice SDNN representa a modulação autonômica global^{27,29}, e a análise dos dados demonstra diminuição desta a partir da administração do fármaco. Este esperado efeito converge com dados de trabalhos anteriores, demonstrando diminuição da VFC sob efeito do sistema nervoso autônomo simpático^{27,29}. Todavia,

a intensificação deste efeito no grupo controle, quando comparado com o Ts65Dn, não havia sido prevista ou relatada anteriormente.

Os índices geométricos da variabilidade da frequência cardíaca (Tabela 2) apontam resultados estatisticamente significativos entre os grupos para o índice SD2 e para a razão SD1/SD2. Além disso, após a inoculação intraperitoneal de isoprenalina, observamos uma resposta semelhante ao visto para o índice SDNN, enfatizando o que parece ser uma ação menos expressiva desse medicamento nos camundongos modelos da SD.

Dados de trabalhos anteriores na literatura, mostraram haver ligação entre a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e a densidade de receptores B1 adrenérgicos presentes no miocárdio. Essas diferenças fenotípicas no músculo cardíaco já foram reportadas anteriormente em ratos, mostrando que alterações na VFC não estão somente relacionadas ao número de eferências do sistema nervoso autônomo no tecido cardíaco, mas também às modificações diretas deste em termos de quantidade de receptores disponíveis^{88,89,90}.

Os dados do nosso trabalho, mostrados por meio dos índices SD2 e SDNN, convergem com os apresentados em um artigo publicado em 1996⁸⁸. Os pesquisadores estudaram camundongos transgênicos com superexpressão de receptores B1 adrenérgicos atriais. Utilizando o propranolol, um fármaco beta bloqueador, foi possível verificar aumento considerável da VFC após administração do medicamento nos camundongos controle, contudo esse efeito não foi observado nos animais transgênicos.

Com relação ao agonista colinérgico, a análise dos índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo (tabela 3) não apresentou

resultados estatisticamente significativos. Contudo, esta análise demonstrou o efeito esperado do carbacol em camundongos Ts65Dn. O índice MeanRR, que representa a média dos intervalos RR, em repouso foi ligeiramente menor nos camundongos Ts65Dn. Após a inoculação do fármaco, este índice apresentou aumento significativo em ambos os grupos, mostrando redução expressiva da frequência cardíaca dos animais.

O índice RMSSD, representativo da ação parassimpática, no momento repouso (M0), teve resposta convergente com a encontrada no mesmo índice antes da ação do agonista adrenérgico. Os camundongos do grupo experimental obtiveram valores maiores que no grupo controle, reforçando a tese de que os animais modelos da SD tendem a ter maior modulação vagal em repouso^{86,87}.

Este mesmo índice, após a administração do medicamento (carbacol), mostrou intensificação esperada da ação vagal em ambos os grupos, apesar de não apresentar significância estatísticas nos resultados. Quando analisado o grupo Ts65Dn, mostrou aumento mais expressivo que no grupo controle, indicando maior atividade vagal nos camundongos do grupo experimental.

Este efeito pode potencialmente ser explicado pela ação dos canais de potássio dependentes de proteína-G (GIRK). O gene que expressa a subunidade 2 desses canais, conhecido como *GIRK2*, foi localizado no cromossomo 21 nos seres humanos, e no cromossomo 16 nos camundongos. Em ambos os casos há trissomia desses cromossomos, o que pode culminar na super expressão desses genes na SD e nos modelos Ts65Dn⁹¹.

Sabe-se que os canais GIRK são modulados por uma variedade de receptores de neurotransmissores acoplados a proteína-G (GPCRs) incluindo

receptores muscarínicos (m_2)⁹². Portanto, essa super expressão nos animais modelos, pode evidenciar os efeitos do carbacol nesses receptores m_2 , já que se trata de um agonista colinérgico não seletivo, explicando o resultado apresentado pelo nosso trabalho.

Já com relação ao SDNN, o índice que representa a atividade autonômica global (tabela 3), durante o período de repouso (M0), este índice apresentou valores levemente menores nos animais modelos da SD quando comparados com os controles, mais uma vez, mostrando haver um déficit autonômico nos Ts65Dn. Todavia não houve significância estatística dos dados. Depois da inoculação do fármaco, pôde-se observar aumento do índice em questão mostrando o, já previsto, aumento da atividade vagal nos dois grupos analisados. Apesar de não haver significância nos dados apresentados, vale observar uma diferença peculiar entre os dois grupos logo após a ação medicamentosa do sistema nervoso autônomo parassimpático, em que houve aumento menos expressivo no grupo experimental em relação ao controle.

Os resultados provenientes da tabela 4, que representam os índices geométricos da VFC não apresentaram significância estatística, contudo vale ressaltar alguns aspectos observados. O índice SD1 representa a modulação vagal e, como no índice RMSSD (tabela 3) apresentou valor ligeiramente menor no momento repouso (M0) para o grupo controle. Contudo, após a injeção intraperitoneal de carbacol, observamos o aumento do mesmo, indicando esperada elevação de ação colinérgica em ambos os grupos. Vale ressaltar que os animais Ts65Dn apresentaram aumento ligeiramente maior que no grupo controle apesar de não apresentar dados estatisticamente significativos.

Este efeito foi o mesmo apontado na análise do índice RMSSD, que também representa a atividade vagal. Reiterando a tese de que, a super expressão dos canais GIRK2, nos camundongos modelos da SD poderia aumentar o efeito colinérgico nesses animais.

Sobre o índice SD2, representante da modulação global, observou-se redução semelhante ao mostrado no índice SDNN (tabela 3). O grupo controle, em repouso (M0), apresentou valor levemente maior que o grupo experimental indicando haver déficit de modulação global nos animais modelos. Outro ponto interessante foi o aumento do índice devido a inoculação de carbacol. O grupo Ts65Dn teve aumento menos intenso quando comparado com os animais do grupo controle. Estes achados convergem com os dados apresentados na tabela 2, em que, os camundongos tiveram respostas menos intensas ao isoproterenol, lembrando que estes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados.

A isoprenalina, como já abordado anteriormente, é uma catecolamina sintética e, portanto, pertence ao grupo de fármacos cuja inativação metabólica depende em grande parte da catecol-O-metiltransferase (COMT) por O-metilação ou, ainda, por desaminação pelas monoamino oxidases (MAO)⁶⁹. Portanto, deve-se considerar a possibilidade de haver diferenças nas concentrações dessas enzimas, o que faria com que os mesmos tivessem tempo de ação distintas entre os dois grupos de camundongos.

O outro fármaco utilizado em nosso estudo, um éster sintético da colina, não seletivo de receptores colinérgicos, age em todos os subtipos de receptores muscarínicos e nicotínicos, e parece não sofrer ação das

acetilcolinesterases. Sendo assim, o metabolismo deste fármaco ainda não está completamente elucidado na literatura⁷².

Outra resposta possível para os resultados encontrados pelo nosso trabalho seria o que hoje é estudado pela farmacogenética e que, busca entender diferentes ações que alguns medicamentos podem apresentar em indivíduos da mesma espécie⁹³. Dessa forma, se os camundongos analisados mostrarem sensibilidade distintas entre eles, a resposta desses fármacos nos animais também seria diferente. Contudo não foram encontrados estudos que avaliaram diferentes ações possíveis da isoprenalina ou do carbacol sobre a modulação autonômica cardíaca.

Com relação à densidade de receptores adrenérgicos e colinérgicos presentes no miocárdio, vários estudos buscaram encontrar e discutir essas possíveis diferenças^{88,90}. Dessa forma, pôde-se entender que, a VFC não depende somente da ação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, mas também da quantidade de receptores presentes no tecido cardíaco, possibilitando respostas distintas inclusive em indivíduos da mesma espécie.

Em um estudo da década de 90, pesquisadores quantificaram os receptores beta 1-adrenérgicos e muscarínicos em ratos Wistar. Os dois grupos avaliados eram compostos de animais normais e ratos com estenose aórtica abdominal (EAA) induzida cirurgicamente. O grupo experimental apresentou hipertrofia considerável de ventrículo esquerdo após 6 semanas da cirurgia. E, com relação a quantidade de receptores, observou-se redução de 25% nos receptores beta 1-adrenergicos e de 25 a 30% de muscarínicos nos ratos do grupo EAA.

Por conseguinte, os nossos resultados nos permitem levantar outras hipóteses que poderão ser avaliadas em estudos futuros sobre a quantidade de enzimas degradadoras dos fármacos utilizados, presentes nesses camundongos, além da sensibilidade dos animais com relação a esses agentes químicos, ou, ainda, a quantidade de receptores adrenérgicos e colinérgicos do grupo experimental em comparação ao controle. Finalmente, vale lembrar que os animais Ts65Dn, por apresentarem super expressão do gene *GIRK2*, podem estar sofrendo aumento da resposta colinérgica, aumentando a ação parassimpática e, consequentemente explicando o aumento encontrado da variabilidade da frequência cardíaca nesses modelos da SD.

Assim, nossos resultados nos permitiram abordar a variabilidade da frequência cardíaca de um modo diferente dos apresentados na literatura atual. Primeiro avaliamos a VFC no camundongo mais utilizado como modelo da síndrome de Down, o Ts65Dn. (Nenhum estudo anterior havia abordado a VFC em modelos dessa anomalia genética.) Depois fizemos uma indução farmacológica da ação dos sistemas nervoso autônomo simpático e parassimpático, por meio de isoproterenol e carbacol respectivamente, o que nos permitiu buscar entender melhor as divergências de opiniões relacionadas ao controle autônomo do coração desses animais modelos da SD.

6 CONCLUSÕES

Mediante as análises realizadas neste trabalho, foi possível apontar que os camundongos modelos da síndrome de Down, o Ts65Dn, apresentam déficit na modulação autonômica cardíaca quando comparados com o grupo controle, mostrados principalmente pela redução de índices relacionados a variabilidade global (SD2 e SDNN).

Os animais pertencentes ao grupo experimental manifestaram efeitos menos expressivos relacionados aos fármacos utilizados neste estudo (Isoproterenol e Carbacol). Tal comportamento pode estar vinculado à redução de receptores adrenérgicos e colinérgicos presentes no tecido cardíaco desses animais modelos, que por sua vez, pode estar relacionado com a presença de doenças cardiológicas crônicas que parecem causar diminuição desses receptores no miocárdio. Visto que alguns camundongos Ts65Dn (aproximadamente 17%) apresentam malformações cardíacas congênitas^{24,25}, podemos também especular que o observado déficit na modulação autonômica cardíaca possa estar de alguma forma associada à mesma entidade etiológica por trás de tais malformações.

7 REFERÊNCIAS

1. Bernal JE, Briceno I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia–Ecuador. *Clin Genet* 2006; 70: 188–191.
2. Down JLH. Observations on an ethnic classifications of idiots. *Clinical Lecture Reports* 1866; 3:259.
3. Mégarbane A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, Rethoré MO et al. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: The past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genet Med* 2009;11(9):611–616.
4. Roubertoux PL and Kerdelhue B. Trisomy 21: From Chromosomes to Mental Retardation. *Behavior Genetics*, Vol. 36, No. 3, May 2006. DOI: 10.1007/s10519-006-9052-
5. Allen G, Benda CE, Böök JA, et al. Mongolism. *Am J Hum Genet* 1961;13: 426.
6. Mustacchi Z. Curvas padrão pôndero-estatural de portadores de síndrome de Down procedentes da região urbana da cidade de São Paulo [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.
7. Lejeune J: Le mongolism: premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Genet* 1959; 1:1–49.
8. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Ethude des chromossomes somatique des neufs enfants mongolies. *CR. Acad. Sci. Paris* 1959; 288:1721-22.
9. Costa ACS. On the Promise of Drug Therapies for Down Syndrome. *Dev Neurosci* 2011;33:414–427.
10. We Qijerman ME, Winter JP. The care of children with Down syndrome. *Eur J Pediatr* 2010; 169:1445–1452.
11. Miller OJ. Alfred Gropp (1924-1983). *Cytogenet. Cell Genet.* 38: 1-4 (1984)
12. Davisson MT. e Costa ACS. Mouse models of Down Syndrome. In: Popko, Brian (Ed.). *Mouse models in the study of genetic neurological disorders*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 1999. cap. 13.
13. Gupta M, Dhanasekaran AR, Gardiner KJ. Mouse models of Down syndrome: gene content and consequences. *Mamm Genome*. 2016 Dec;27(11-12):538-555.
14. Herault Y, Delabar JM, Fisher EMC, Tybulewicz VLJ, Yu E, Brault V. Rodent models in Down syndrome research: impact and future opportunities. *Dis Model Mech*. 2017 Oct 1;10(10):1165-1186. doi: 10.1242/dmm.029728.
15. Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sosodia SS, Schmidt C, Bronson RT, Davisson MT. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behavior deficits. *Nature Genetics*. v. 11, p. 177-184, 1995.

16. Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Vallina IF, Baamonde C, Lumberras MA, Dierssen M, Tobeña A, Flórez J. A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett*. 1995 Oct 20;199(2):143-6.
17. Klein SL, Kriegsfeld LJ, Hairston JE, Rau V, Nelson RJ, Yarowsky PJ. Characterization of sensorimotor performance, reproductive and aggressive behaviors in segmental trisomic 16 (Ts65Dn) mice. *Physiol Behav*. 1996 Oct;60(4):1159-64.
18. Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Villar AJ, Epstein CJ, Malenka RC, and Mobley WC. Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 37, pp. 8153–8160, 2004.
19. Costa AC e Grybko MJ. Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *Neuroscience Letters*, vol. 382, no. 3, pp. 317–322, 2005.
20. Siarey RJ, Carlson EJ, Epstein CJ, Balbo A, Rapoport SI, Galdzicki Z. Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology*, vol. 38, no. 12, pp. 1917–1920, 1999.
21. Siarey RJ, Villar AJ, Epstein CJ, Galdzicki Z. Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology*, vol. 49, no. 1, pp. 122–128, 2005.
22. Scott-McKean JJ and Costa AC. Exaggerated NMDA mediated LTD in a mouse model of Down syndrome and pharmacological rescuing by memantine. *Learning & Memory*, vol. 18, no. 12, pp. 774–778, 2011.
23. Scott-McKean JJ, Roque AL, Surewicz K, Johnson, MW; Surewicz WK, Costa ACS. Pharmacological Modulation of Three Modalities of CA1 Hippocampal Long-Term Potentiation in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *Neural Plasticity*, v. 2018, p. 1-14, 2018. doi.org/10.1155/2018/9235796.
24. Moore CS. Postnatal lethality and cardiac anomalies in the Ts65Dn Down syndrome mouse model. *Mamm Genome*. 2006 Oct;17(10):1005-12.
25. Williams AD, Mjaatvedt CH and Moore CS. Characterization of the Cardiac Phenotype in Neonatal Ts65Dn Mice. *Developmental Dynamics*, 237:426–435, 2008
26. Lorandau CG, Hakkinen LA, Moore CS. Cardiovascular development and survival during gestation in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011 Jan;294(1):93-101. doi: 10.1002/ar.21301.
27. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*. 1996; 93(5):1043-65.

28. Campen MJ, Tagaito Y, Jenkins TP, et al. Heart rate variability responses to hypoxic and hypercapnic exposures in different mouse strain. *J Appl Physiol*. 2005;99:807-813.
29. Vanderlei LC, Pastre CM, Hoshi RA, Carvalho TD, Godoy MF. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009; 24:205–217.
30. Park HJ, Zhang Y, Du C, et al. Role of SREBP-1 in the development of parasympathetic dysfunction in the hearts of type 1 diabetic Akita mice. *Circ Res*. 2009 Jul 31;105(3):287-94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.193995.
31. Liu J, Wei W, Kuang H, et al. Heart Rate and Heart Rate Variability Assessment Identifies Individual Differences in Fear Response Magnitudes to Earthquake, Free Fall, and Air Puff in Mice. *PLoS One*. 2014; 9(3): e93270. doi: 10.1371/journal.pone.0093270
32. Fernhall B, Pitetti KH, Rimmer JH, McCubbin JA, Rintala P, Millar AL. Cardiorespiratory capacity of individuals with mental retardation including Down syndrome. *Med Sci Sports Exerc*. 1996 Mar;28(3):366-71.
33. Guerra M, Roman B, Geronimo C, Violan MA, Cuadrado E, Fernhall B. Physical fitness levels of sedentary and active individuals with Down syndrome. *Adapt Phys Act Q* 2000;17:310-21.
34. Fernhall B, McCubbin JA, Pitetti KH, Rintala P, Rimmer JH, Millar AL. Prediction of maximal heart rate in individuals with mental retardation. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Oct;33(10):1655-60.
35. Guerra M, Llorens N, and Fernhall B. Chronotropic incompetence in individuals with Down syndrome. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84: 1604–1608.
36. Fernhall B; Otterstetter M. Attenuated responses to sympathoexcitation in individuals with Down syndrome. *J Appl Physiol* 2003; 94: 2158–2165.
37. Figueroa A, Collier S, Baynard T, Giannopoulou I, Gouloupoulou S, Fernhall B. Impaired vagal modulation of heart rate in individuals with Down syndrome. *Clin. Autonomic Res*. 2005; 15:45-50.
38. Fernhall Bo, Mendonca GV, Baynard T. Reduced work capacity in individuals with Down syndrome: a consequence of autonomic dysfunction? *Exerc. Sport Sci. Rev*. 2013; 41(3):138-147.
39. Iellamo F, Galante A, Legramante JM, Lippi ME, Condoluci C, Giorgio Albertini, Volterrani M. Altered autonomic cardiac regulation in individuals with Down syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H2387–H2391.
39. De Carvalho TD, de Abreu LC, Mustacchi Z, Vanderlei LC, Godoy MF, Raimundo RD, et al. Cardiac autonomic modulation of children with Down syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2015 Feb;36(2):344-9. doi: 10.1007/s00246-014-1012-5

40. Carvalho TD, Massetti T, Silva TDD, Crocetta TB, Guarnieri R, Vanderlei LCM, et al. Heart rate variability in individuals with Down syndrome - A systematic review and meta-analysis. *Auton Neurosci*. 2018 Sep;213:23-33. doi: 10.1016/j.autneu.2018.05.006.
41. Bull MJ; Committee on Genetics. Health supervision for children with Down syndrome. *Pediatrics*. 2011 Aug;128(2):393-406. doi: 10.1542/peds.2011-1605.
42. Presson AP, Partyka G, Jensen KM, Devine OJ, Rasmussen SA, McCabe LL. Current estimate of Down Syndrome population prevalence in the United States. *J Pediatr*. 2013 Oct;163(4):1163-8. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.06.013.
43. Van Gameren-Oosterom HBM, Van Dommelen P, Oudesluys-Murphy AM, Buitendijk SE, Van Buuren S, et al. Healthy Growth in Children with Down Syndrome. *PLoS ONE* 2012; 7(2): e31079.
44. Bermudez BEBV, Medeiros SL, Bermudez MB, et al., Down syndrome: Prevalence and distribution of congenital heart disease in Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2015; 133(6):521-4. DOI: 10.1590/1516-3180.2015.00710108
45. Starbuck JM. On the Antiquity of Trisomy 21: Moving Towards a Quantitative Diagnosis of Down Syndrome in Historic Material Culture. *Journal of Contemporary Anthropology* 2011; 2: 17- 44.
46. Angiovlasitis S, BaynardT, Pitetti KH, Fernhall Bo. Heart rate complexity in response to upright tilt in persons with Down syndrome. *Research in Developmental Disabilities* 2011; 32: 2102–2107.
47. O'Driscoll DM, Horne RS, Davey MJ, Hope SA, Walker AM, Nixon GM. The heart rate response to spontaneous arousal from sleep is reduced in children with Down syndrome referred for evaluation of sleep-disordered breathing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H1986–H1990.
48. Ferri R, Dascalova LC, Del Gracco S, Elia M, Musumeci SA, PETTINAT S. Heart rate variability and apnea during sleep in Down's syndrome. *J. Sleep Res*. 1998; 7: 282–287.
49. Pavarino BEC, Biselli JM, Bonfim D, Goloni-Bertollo EM. Clinical profile of children with down syndrome treated in a genetics outpatient service in the southeast of Brazil. *Rev. Assoc. Med. Bras. [serial on the Internet]*. 2009, 55(5): 547-552.
50. Silva MFMC, Kleinhans ACS. Processos cognitivos e plasticidade cerebral na Síndrome de Down. *Rev. Bras. Ed. Esp., Marília, Jan.-Abr. 2006, 12(1),123-138.*
51. Dierssen M, Vallina IF, Baamonde C, García-Calatayud S, Lumbreras MA, Flórez J. Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res*. 1997 Feb 28;749(2):238-44.
52. Reller MD, Morris CD. Is Down syndrome a risk factor for poor outcome after repair of congenital heart defects? *J Pediatr* 1998;132:738-41.

53. Chicoine B, McGuire D. Longevity of a woman with Down syndrome: a case study. *Ment Retard.* 1997;35(6):477–479.
54. Glasson EJ, Sullivan SG, Hussain R, Petterson BA, Montgomery PD, Bittles AH. The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling. *Clin Genet.* 2002; 62(5):390–393.
55. Mendonça GV, Pereira FD, Fernhall B. Reduced exercise capacity in persons with Down syndrome: cause, effect, and management. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2010; 6:601–610.
56. Franco NH. Animal experiments in biomedical research: A historical perspective. *Animals.* 3,238-273, 2013
57. Debernardi A, Sala E, D'Aliberti G, et al. Alcmaeon of Croton. *Neurosurgery.* 66: 247-252, 2010. doi: 10.1227/01.NEU.0000363193.24806.02.
58. Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL. A brief history of animal modeling. *Mo Med.* 110(3): 201-205, 2013.
59. Ribatti D. William Harvey and the discovery of the circulation of the blood. *J Angiogenes Res.* 2009 Sep 21;1:3. doi: 10.1186/2040-2384-1-3.
60. Waterston RH Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 420, 2002.
61. Santos BF. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de laboratório: criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p.115-8.
62. Leon LR. The use of gene knockout mice in thermoregulation studies. *J Therm Biol* 2005; 30: 273-88.
63. Dukes HH. *Fisiologia de los animales domésticos.* Madrid: Aguilar, 1960. p.134-66.
64. Woodbury RA, Hamilton WF. Blood pressure studies in small animals. *American J Physiol* 1937; 119(4): 663-74.
65. Costa AC, Scott-McKean JJ. Prospects for improving brain function in individuals with Down syndrome. *CNS Drugs.* 2013 Sep;27(9):679-702. doi: 10.1007/s40263-013-0089-3.
66. Holtzman DM, Santucci D, Kilbridge J, et al. Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* Vol. 93, pp. 13333–13338, 1996.
67. Nicoll RA, A brief history of long-term potentiation. *Neuron,* vol. 93, no. 2, pp. 281–290, 2017.
68. Kennedy MB, Synaptic signaling in learning and memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,* vol. 8, no. 2, article a016824, 2013.

69. Tu Y; Piascik MT e Abel PW. Agonistas adrenérgicos. In: Yagiela JA (Ed.). *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. cap. 6. pp 97.
70. McMahon, A. W., Levenson, M. S., McEvoy, B. W., Mosholder, A. D., & Murphy, D. (2011). Age and risks of FDA-approved long-acting β 2- adrenergic receptor agonists. *Pediatrics*, 128(5), e1147–e1154.
71. Allawadhi P, Khurana A, Sayed N, Kumari P, Godugu C. Isoproterenol-induced cardiac ischemia and fibrosis: Plant- based approaches for intervention. *Phytotherapy Research*. 2018;1–25. DOI: 10.1002/ptr.6152
72. Dowd FJ. Fármacos Colinérgicos. In: Yagiela JA (Ed.). *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. cap. 8. pp 117-127.
73. Tseng I, Tang SC, Chang CY, Lin YC, Abbod MF, Shieh JS. Nonlinear and Conventional Biosignal Analyses Applied to Tilt Table Test for Evaluating Autonomic Nervous System and Autoregulation. *The Open Biomedical Engineering Journal* 2013; 7:93-99.
74. Karim N, Hasan JA, Ali SS. Heart rate variability – a review. *Journal of Basic and Applied Sciences* 2011; 7(1): 71-77.
75. Pumpirla J, Howorka K, Groves D, Chester M, Nolan J. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. *Int J Cardiol* 2002; 84:1-14.
76. Godoy MF, Takakura IT, Correa PR. Relevância da análise do comportamento dinâmico não-linear (Teoria do Caos) como elemento prognóstico de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. [The relevance of nonlinear dynamic analysis (Chaos Theory) to predict morbidity and mortality in patients undergoing surgical myocardial revascularization]. *Arq Ciênc Saúde*. 2005;12(4):167–171. Portuguese.
77. Jurca R, Church TS, Morss GM, Jordan AN, Earnest CP. Eight weeks of moderate intensity exercise training increases heart rate variability in sedentary postmenopausal women. *Am Heart J*. 2004;147(5):e8-e15.
78. Thuraisingham RA. Preprocessing RR interval time series for heart rate variability analysis and estimates of standard deviation of RR intervals. *Comp Meth Progr Biomed*. 2006;8(3):78-82.
79. Vanderlei LC, Pastre CM, Freitas Júnior IF, Godoy MF. Geometric indexes of heart rate variability in obese and eutrophic children. *Arq Bras Cardiol*. 2010; 95(1):35-40.
80. Dias De Carvalho T, Pastre CM, Rossi RC, Abreu LC, Valenti VE, Vanderlei LCM. Geometric index of heart rate variability in chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Port Pneumol* 2011; 17(6):260-265
81. Friedman BH. An autonomic flexibility–neurovisceral integration model of anxiety and cardiac vagal tone. *Biological Psychology*. 2007; 74: 185–199.

82. Rassi Jr. A. Compreendendo melhor as medidas de análise da variabilidade da frequência cardíaca. J Diag Cardiol. 8 ed., 2000. Disponível em: <http://www.cardios.com.br/noticias_detalhes.asp?idNoticia=331&IdSecao=24&IdTipoNoticia=7&cientifico=¬icias=&idmenu=>. acesso em 17/09/2018 às 21h00.
83. Roque AL, Valenti VE, Massetti T, da Silva TD, Monteiro CB3, Oliveira FR. Chronic obstructive pulmonary disease and heart rate variability: a literature update. Int Arch Med. 2014 Oct 3;7:43. doi: 10.1186/1755-7682-7-43.
84. Nyström T, Santos-Pardo I, Fang X, Cao Y, Hedberg F, Jendle J. Heart rate variability in type 2 diabetic subjects randomized to liraglutide or glimepiride treatment, both in combination with metformin: A randomized, open, parallel-group study. Endocrinol Diabetes Metab. 2019 Feb 6;2(2):e00058. doi: 10.1002/edm2.58. eCollection 2019.
85. Akgul F, Batyraliev TA, Fettser DV, Seyfeli E, Arystan AG, Seydaliyeva T, et al. Decreased Heart Rate Variability in Sick Cell Anemia as Effect of Pulmonary Arterial Hypertension. Kardiologija. 2019 Apr 17;59(4):39-44. doi: 10.18087/cardio.2019.4.10237.
86. Fernhall B, Pitetti K, Renaud M, Wondra VC. Autonomic control of resting and exercise heart rate in adolescents with Down syndrome [abstract]. Pediatr Exerc Sci 1998;11:269.
87. Baynard T, Pitetti KH, Guerra M, Fernhall B. Heart Rate Variability at Rest and During Exercise in Persons With Down Syndrome. Arch Phys Med Rehabil V 85, 1285-1290, 2004.
88. Mansier P, Médigue C, Charlotte N, Vermeiren C, Coraboeuf E, Deroubai E, et al. Decreased heart rate variability in transgenic mice overexpressing atrial beta 1-adrenoceptors. Am J Physiol. 1996 Oct;271(4 Pt 2):H1465-72.
89. Carré F, Maison-Blanche P, Ollivier L, Mansier P, Chevalier B, Vicuna R, et al. Heart rate variability in two models of cardiac hypertrophy in rats in relation to the new molecular phenotype. Am J Physiol. 1994 May;266(5 Pt 2):H1872-8.
90. Mansier P, Chevalier B, Barnett DB, Swynghedauw B. Beta adrenergic and muscarinic receptors in compensatory cardiac hypertrophy of the adult rat. Pflugers Arch. 1993 Aug;424(3-4):354-60.
91. Stasko MR, Scott-McKean JJ, Costa AC. Hypothermic responses to 8-OH-DPAT in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. Neuroreport. 2006 May 29;17(8):837-41.
92. Costa AC, Stasko MR, Stoffel M, Scott-McKean JJ. G-protein-gated potassium (GIRK) channels containing the GIRK2 subunit are control hubs for pharmacologically induced hypothermic responses. J Neurosci. 2005 Aug 24;25(34):7801-4.

93 Weitzel KW, Cavallari LH, Lesko LJ. Preemptive Panel-Based Pharmacogenetic Testing: The Time is Now. *Pharm Res.* 2017 Aug; 34(8): 1551–1555. doi: 10.1007/s11095-017-2163-x

8 ANEXOS

Anexo A: Aprovação do comitê de ética em pesquisas em animais da Universidade Case Western Reserve – Cleveland – OH – EUA.



Date: February 16, 2016

Name: Alberto C Costa, MD, PhD

Title: Potential Pharmacotherapies for rescuing learning and memory deficits in mouse models of Down syndrome

Protocol Number: 2016-0013

Species: Mouse 2508

This Institution's Animal Care and Use Committee reviewed and approved the Animal Experimentation 2016-0013. The Committee has approved this protocol for a period of three years, beginning 02/16/2016 through and ending 02/16/2019.

Before ordering animals, it is important to confirm that all animal handlers have completed their necessary training and have access to the animal facility. If animals are ordered prematurely, your staff will not have access to the animals or be able to schedule procedures associated with this protocol. For information on Training Requirements and Facility Access please visit the IACUC Training page <http://casemed.case.edu/ora/iacuc/training.cfm>.

While the approved protocol covers 3 years, annual updates are due on the anniversary of the original approval. The IACUC office will send you an annual review form that may be completed electronically and sent to the IACUC office by email.

Please remember that any change to the scope of your animal protocol must be submitted to the IACUC office for Committee review and approval. No work may begin on a proposed addendum until final written approval by the IACUC chair is received by the principal investigator.

If this protocol supports a federally funded grant or sponsored project you must alert your office of grants and contracts if this protocol expires or is otherwise terminated. You must alert grants and contracts if a new protocol is approved to replace or add to the current protocol.

To aid in extramural grant submissions, the following description may be used as a guide for NIH and other grant submissions:

The animals described in this study will be housed in the AAALAC accredited facilities of the CWRU School of Medicine (SOM). Standard Operating Procedures and reference materials are available from the IACUC Office for animal use. The animal health program for all Case owned laboratory animals is directed by the Case Animal Resource Center Director, W. John Durfee, DVM, Diplomate ACLAM, and provided by two full-time veterinarians. Animals in each room are observed daily for signs of illness by the animal technician responsible for providing husbandry. Medical records and documentation of experimental use are maintained individually for non-rodents and individually or by cage group for rodents. Veterinary technicians under the direction of the attending veterinarian provide routine veterinary medical care to all animals. Animal care and use is additionally monitored for training and compliance issues by the Training and Compliance Manager. The Case Assurance number is A-3145-01, valid until April 30, 2019.

Sincerely yours,

Signature applied by Agata A Exner on 02/16/2016 06:14:08 PM EST

Agata A Exner
IACUC Chair

Anexo B: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA NO MODELO MURINO DA SÍNDROME DE DOWN □ TS65DN", protocolada sob o CEUA nº 9789301019 (ID 009266), sob a responsabilidade de **Adriano Luís Roque e equipe; Talita Dias da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 18/11/2019.

We certify that the proposal "Cardiac autonomic modulation in a mouse model of Down syndrome □ Ts65Dn", utilizing 0 Transgenics mice (), protocol number CEUA 9789301019 (ID 009266), under the responsibility of **Adriano Luís Roque and team; Talita Dias da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 11/18/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [01/2020](#) a [06/2020](#)

Área: [Cardiologia/medicina](#)

Origem: [Animais provenientes de outros projetos](#)

Espécie: [Camundongos transgênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 6 meses](#)

N: [0](#)

Linhagem: [Ts65Dn](#)

Peso: [25 a 50 g](#)

Local do experimento: Os procedimentos foram realizados nos laboratórios do Centro de Recursos Animais (ARC □ Animal Resource Center) da Universidade Case Western Reserve em Cleveland, Ohio nos Estados Unidos da América, em salas com temperatura ambiente (22 oC).

São Paulo, 18 de novembro de 2019

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

